

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE  
PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

INDUZIEREN ZYTOTOXISCHE BEHANDLUNGEN VON  
MAMMAKARZINOMZELLEN EINE TUMORZELL-DEDIFFERENZIERUNG *IN-  
VITRO*?

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Cynthia Kohl

2018



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE  
PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

INDUZIEREN ZYTOTOXISCHE BEHANDLUNGEN VON  
MAMMAKARZINOMZELLEN EINE TUMORZELL-DEDIFFERENZIERUNG *IN-  
VITRO*?

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Cynthia Kohl

2018

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff

2. Berichterstatter:

PD. Dr. rer. nat. Richard Bauer

Tag der mündlichen Prüfung:

03. April 2019

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	7
1.1	Brustkrebs und Metastasen .....	7
1.2	Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT).....	8
1.3	Vom Primärtumor zur Metastase, von DTC und anderen Begrifflichkeiten.....	9
1.4	Tumorigenese, Stammzellen und Brustkrebsstammzellen .....	9
1.5	EMT näher betrachtet .....	11
1.5.1	Signalwege und Transkriptionsfaktoren.....	11
1.5.2	Differenzierungsmerkmale für den epithelialen beziehungsweise mesenchymalen Phänotyp.....	15
1.6	Krebsstammzellen und Marker.....	16
1.6.1	Oberflächenmarker .....	16
1.6.2	Signalwege .....	16
1.6.3	Funktionelle Eigenschaften .....	16
1.7	Stammzellen können durch EMT entstehen .....	18
1.8	Weitere Marker.....	18
1.9	Auswirkung zytostatischer Behandlung auf EMT und CSCs .....	21
1.10	Können Mammakarzinomzellen unter zytostatischer Behandlung <i>in vitro</i> dedifferenzieren? .....	22
2	Theoretische Grundlagen .....	24
2.1	Durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik .....	24
2.1.1	FACSCanto II.....	24
2.1.2	Multicolor Assays .....	25
2.1.2.1	Spillover und Compensation.....	28
2.1.2.2	FACS-Einstellungen für die 6-Farb-Assays nach vollzogener Compensation .....	30
2.1.2.3	Stain Index .....	31
2.1.2.4	Datendarstellung und -verarbeitung.....	31
2.1.3	Proliferationsanalysen .....	32
2.1.3.1	Datendarstellung und -verarbeitung.....	36
3	Material .....	37
3.1	Untersuchte Zelllinien .....	37
3.2	Medien und Zusätze für die Zellkultur .....	37
3.3	Puffer und Lösungen .....	38
3.4	Antikörper.....	39

3.5	DNA-Farbstoffe, Enzyme.....	40
3.6	Gebrauchsfertige Reagenzien (KITS) .....	40
3.7	Reagenzien und Chemikalien .....	41
3.8	Verbrauchsmaterial.....	41
3.9	Geräte.....	42
3.10	Software.....	43
4	Methoden .....	44
4.1	Zellkultur .....	44
4.1.1	Standardkultur .....	44
4.1.1.1	Zellernte und Zellzahlbestimmung .....	44
4.1.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	44
4.1.2	Behandlung der Zellen .....	45
4.1.2.1	Zytostatika Behandlung .....	45
4.1.2.2	Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).....	46
4.2	<i>Mammosphere</i> -Assay - Dreidimensionale Zellkultur.....	48
4.3	Durchflussszytometrische Fluoreszenzanalytik .....	51
4.3.1	Oberflächenmarkermessung mittels 6-Farb-Assays.....	51
4.3.2	Proliferationsmessungen mit DAPI.....	52
4.4	Proteinbiochemische Methoden .....	52
4.4.1	Herstellung von Lysepuffer und denaturierten Proteinlysaten.....	52
4.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein-Assay-Kit .....	53
4.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	53
4.4.4	Westernblot .....	54
4.4.5	Immunochemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz .....	55
4.4.6	Densitometrische Auswertung .....	56
4.5	Statistische Auswertung .....	56
5	Ergebnisse .....	58
5.1	Proliferationsbestimmungen mittels durchflussszytometrisch gemessener S-Phasen und rechnerisch bestimmter Verdopplungszeiten.....	58
5.1.1	Analyse der Verdopplungszeiten der langfristig zytostatisch behandelten BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen .....	59
5.1.2	Proliferationsanalysen der mit hochkonzentriertem Paclitaxel kurzzeitig behandelten BT-474-Zellen .....	61
5.2	Durchflussszytometrisch erstellte 6-Farb-Assays zur Quantifizierung der Oberflächenmarkerexpression von EMT-Markern auf mit Paclitaxel, Epirubicin und TGF- $\beta$ 1 behandelten Mammakarzinomzellen.....	62

5.2.1	6-Farb-Assays der langfristig mit Zytostatika behandelten BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen .....	62
5.2.2	Durchflusszytometrisch erstellte 6-Farb-Assays zur Quantifizierung der Oberflächenmarker von BT-474 Zellen nach kurzzeitiger Paclitaxel Behandlung .....	69
5.2.3	Durchflusszytometrisch erstellte 6-Farb-Assays zur Quantifizierung der Oberflächenmarkermoleküle der TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen .....	70
5.3	Proteinchemische Darstellung von EMT-Markern nach kurzzeitiger beziehungsweise langzeitiger Behandlung von Mammarkarzinomzellen mit Paclitaxel, Epirubicin und TGF- $\beta$ 1 .....	71
5.3.1	Westernblots der Zytostatika behandelten Zellen .....	71
5.3.2	Westernblots der TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen .....	75
5.4	<i>Mammosphere</i> -Assays unter verschiedenen Paclitaxel-Behandlungen .....	77
5.4.1	BT-474 unter langzeitiger Paclitaxel Behandlung: <i>sphere</i> -Anzahl und -Durchmesser .....	78
5.4.1.1	BT-474 Tag 4, <i>sphere</i> -Anzahl .....	78
5.4.1.2	BT-474 Tag 12, <i>sphere</i> -Anzahl .....	78
5.4.1.3	BT-474 Vergleich Tag 4 und Tag 12, <i>sphere</i> -Anzahl und -Durchmesser ..	79
5.4.2	SK-BR-3 unter langzeitiger Paclitaxel Behandlung: <i>sphere</i> -Anzahl und -Durchmesser .....	81
5.4.2.1	SK-BR-3 Tag 4, <i>sphere</i> -Anzahl.....	81
5.4.2.2	SK-BR-3 Tag 12, <i>sphere</i> -Anzahl.....	81
5.4.2.3	SK-BR-3 Vergleich Tag 4 und Tag 12, <i>sphere</i> -Anzahl und -Durchmesser	81
5.4.3	JIMT-1 unter langzeitiger Paclitaxel Behandlung: <i>sphere</i> -Anzahl und -Durchmesser .....	83
5.4.3.1	JIMT-1 Tag 4, <i>sphere</i> -Anzahl.....	83
5.4.3.2	JIMT-1 Tag 12, <i>sphere</i> -Anzahl.....	83
5.4.3.3	JIMT-1 Vergleich Tag 4 und Tag 12, <i>sphere</i> -Anzahl und -Durchmesser ..	84
5.4.4	BT-474 unter 48-Stunden-Paclitaxel-Behandlung: <i>sphere</i> -Anzahl und -Durchmesser .....	86
5.4.4.1	BT-474 Tag 4, <i>sphere</i> -Anzahl .....	86
5.4.4.2	BT-474 Tag 12, <i>sphere</i> -Anzahl .....	87
5.4.4.3	BT-474 Vergleich Tag 4 und Tag 12, <i>sphere</i> -Anzahl und -Durchmesser ..	87
5.4.5	Aussehen der <i>mammospheres</i> .....	91
5.4.5.1	Aussehen BT-474- <i>spheres</i> .....	91
5.4.5.2	Aussehen SK-BR-3- <i>spheres</i> .....	91
5.4.5.3	Aussehen JIMT-1- <i>spheres</i> .....	92
6	Diskussion.....	93
6.1	Oberflächenmoleküle als Biomarker für EMT und Stammzeleigenschaften .....	93

6.2	EMT-spezifische Proteine .....	96
6.3	<i>Mammospheres</i> zum Nachweis von Stammzellen beziehungsweise Stammzeleigenschaften .....	98
6.4	Diskussion aller Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt Stammzeleigenschaften und EMT .....	101
7	Zusammenfassung.....	106
8	Ausblick .....	107
9	Inhaltsverzeichnis .....	109



# 1 Einleitung

Die häufigste Todesursache von PatientInnen mit Mammakarzinom ist nicht der Primärtumor selbst, sondern dessen Metastasen - Zellen des Primärtumors, die in einem anderen Gewebe einen neuen malignen Zellverband bilden. Trotz neuester Therapie-Ansätze im Bereich systemischer Chemotherapie, Hormon- und Antikörperbehandlung, scheinen Metastasen resistenter gegenüber den konventionellen Therapien zu sein als der Primärtumor. Das Vorliegen von Metastasen bedeutet somit weiterhin eine hohe Letalität für die PatientInnen. Es ist daher ein wichtiges Ziel der Krebsforschung, mehr Erkenntnisse über die Pathogenese der Metastasen auf systemischer, zellulärer und molekularer Ebene zu gewinnen.<sup>1</sup>

## 1.1 Brustkrebs und Metastasen

Neben der lokalen Ausbreitung in Lymphknoten und einer Infiltration der Haut hat Brustkrebs das Potenzial, vor allem bei später Erstdiagnose, prognostisch ungünstigem Tumortyp oder dem Vorliegen eines Rezidivs, hämatogen zu metastasieren.<sup>2</sup> Damit es zur hämatogenen Metastasierung kommt, müssen die Zellen des Primärtumors eine Abfolge mehrerer Schritte durchlaufen: Adhäsionsverlust im Zellverband des Primärtumors, Motilitätszunahme, Invasivität, Eintritt und Überleben im Blutkreislauf, Austritt in neues Gewebe und Kolonisation. Nur einige wenige Tumorzellen schaffen es tatsächlich, alle Bedingungen zu erfüllen.<sup>1</sup> Diese sogenannten Metastasen-initiierenden Zellen befallen während der hämatogenen Metastasierung laut der „*seed and soil*“ Theorie von S. Paget (1889) nicht bevorzugt das am stärksten durchblutete Organ nach dem Primärtumor, sondern Organe, die ein vermeintlich günstiges Mikromilieu (*soil*) für die Tumorzellen (*seed*) aufweisen.<sup>1,3</sup> Brustkrebs metastasiert hämatogen dabei vor allem in Lunge, Pleura, Leber, Knochen und das ZNS.<sup>2</sup>

Wann es im Prozess der Primärtumorbildung zur Metastasierung kommt, ist umstritten. Grundsätzlich gibt es zwei gegensätzliche Modelle: das Kaskadenmodell und das parallele Progressionsmodell. Erstes unterliegt der Annahme, dass sich erst nach Heranwachsen und Ausreifen des Primärtumors zu einer bestimmten Größe Zellen absondern können. Diese sogenannten disseminierten Tumorzellen (DTC) sind somit in dieser Theorie direkte Abkömmlinge des Primärtumors. Folglich können durch die Analyse der Primärtumorzellen Rückschlüsse auf die Zellen der Metastasen geschlossen werden. Das neuere Modell der

parallelen Progression nimmt allerdings an, dass Tumorzellen bereits sehr früh den Ort der Primärläsion verlassen können - noch bevor es überhaupt zur Ausbildung eines vollständigen malignen Phänotyps gekommen ist. Die disseminierten Tumorzellen in diesem Modell entsprechen somit nicht den Zellen des Primärtumors. Falls es zur Metastasierung kommt, entwickeln sich die disseminierten Tumorzellen selbstständig zu Metastasen. Im Vergleich zum Kaskadenmodell können nach dieser Theorie Erkenntnisse über den Primärtumor nicht zwangsläufig auf dessen Metastasen übertragen werden.<sup>4</sup> Beide Modelle widersprechen sich nicht grundsätzlich und eine Metastasierung kann möglicherweise sowohl auf die eine als auch auf die andere Weise erfolgen.

Treten die Zellen der Primärläsion in den Blutkreislauf ein, so bezeichnet man sie als zirkulierende Tumorzellen (CTCs). Verlassen die CTCs das Blutsystem und lassen sich in neuem Gewebe nieder ohne Metastasen zu bilden, werden sie zu disseminierten Tumorzellen (DTCs). Sind diese tumorigen und bilden Metastasen, werden sie als Metastasen-initiiierende Zellen (MICs) bezeichnet.

## **1.2 Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)**

Damit Tumorzellen der Brustdrüse metastasieren können, müssen sie einige Schritte durchlaufen. Dazu gehören unter anderem Adhäsionsverlust im epithelialen Zellverband und Motilitätszunahme, welche den Zellen zur notwendigen Beweglichkeit verhelfen. Um dies zu erreichen, verändern die Tumorzellen ihren Phänotyp: Sie verwandeln sich von epithelialen zu mesenchymalen Zellen. Dieser Prozess, auch Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) genannt, wurde zunächst für die Embryo- und Organogenese beschrieben, bei denen er eine fundamentale Rolle spielt. Im Embryo sind zunächst nur Epithelzellen angelegt. Sie zeichnen sich durch ihre apikal-basale Polarität aus und sind untereinander durch Adhäsionskomplexe verbunden. An der basalen Seite der Zellmembran sind die Pflasterstein-ähnlichen Zellen in der Basalmembran verankert. Die Zellen sind somit relativ unbeweglich. So können Epithelien die unter ihnen gelegenen Gewebe unter anderem vor Infektionen schützen. Um allerdings zu entfernten Orten im Körper zu gelangen, müssen sich die Epithelzellen aus dem Epithelverband lösen. Dies geschieht durch EMT, der Umwandlung von Epithelzellen zu Mesenchymzellen. Diese zeichnen sich durch ihr spindelförmiges Aussehen aus und sind nicht fest in eine Richtung ausgerichtet. Im Gegensatz zu den Epithelzellen gehen sie mit Nachbar-Mesenchymzellen nur temporäre Verbindungen ein und bleiben somit frei beweglich. Das Konzept der EMT lässt sich auch auf Tumorzellen übertragen, die sich von

der epithelialen Primärläsion lösen und einen Zelltyp mit mesenchymalen Eigenschaften entwickeln. Folglich müssen Tumorzellen im Rahmen der Metastasierung eine EMT absolvieren. Sie werden so zunächst zu zirkulierenden beziehungsweise disseminierten Tumorzellen.<sup>5</sup>

Während der Embryo- und Organogenese gelingt es den Zellen sich durch ihren mesenchymalen Charakter an einem ihrem Ursprungsepithel fernen Ort niederzulassen. Dort können sich die Zellen durch erneute Veränderung ihres Phänotyps zu epithelialen Zellen umwandeln. Die EMT ist somit ein reversibler Prozess, dessen Gegensatz als Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET) bezeichnet wird. Dies lässt sich wiederum auf Metastasen-initiiierende Zellen, also auf ausgewählte zirkulierende und disseminierte Tumorzellen, übertragen: Durch MET gelingt es den Zellen, einen neuen malignen epithelialen Zellverband - eine Metastase - zu bilden.

### 1.3 Vom Primärtumor zur Metastase, von DTC und anderen Begrifflichkeiten

**Tabelle 1** Übersicht über Akronyme

<b>Zellen</b>	<b>Akronym</b>	<b>Beschreibung der Zellpopulation</b>
<b>Tumor-initiiierende Zelle</b>	TIC	Zelle des ursprünglichen Organgewebes, die zur Ausbildung eines (Primär)Tumors (Tumorigenese) befähigt ist <sup>6</sup>
<b>disseminierte Tumorzelle</b>	DTC	jede Tumorzelle, die den Ort der Primärläsion verlässt und sich in entfernter Umgebung befindet <sup>4</sup>
<b>zirkulierende Tumorzelle</b>	CTC	im Blut zirkulierende Tumorzelle, die den Ort der Primärläsion verlassen hat und ins Gefäßsystem invadiert ist <sup>7</sup>
<b>Metastasen-initiiierende Zelle</b>	MIC	Tumorzelle, DTC beziehungsweise CTC, die zur Ausbildung von Metastasen befähigt ist <sup>8</sup>
<b>(Brust-)Krebsstammzelle</b>	(B)CSC	Vermeintlich Synonym für TIC, besitzt Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung, Langlebigkeit und Multipotenz <sup>6</sup>

### 1.4 Tumorigenese, Stammzellen und Brustkrebsstammzellen

Ein Tumor zeichnet sich unter anderem durch sein unbegrenztes und unkontrolliertes Wachstum aus. Dieses wird von Zellen im Tumor angetrieben, die stetig proliferieren und unterschiedlich differenzierte Tumorzellen hervorbringen. So entsteht letztendlich ein Tumor aus Zellen eines heterogenen Phänotyps. Allerdings weist nur ein kleiner Bruchteil der

Tumorzellen, wenn experimentell isoliert und an anderer Stelle wiedereingesetzt, das Potenzial auf, einen Tumor zu bilden.<sup>9</sup> Der Grund dafür ist entweder, dass grundsätzlich zwar alle Zellen im Tumor unendlich proliferieren können, aber nur wenige dies mit geringer Wahrscheinlichkeit schaffen. Oder, es ist von vornherein nur eine Minderheit der Tumorzellpopulation zur Tumorigenese befähigt, was im Folgenden angenommen wird. Somit würden nur einige wenige Zellen durch Klonogenität alle Tumorzellen generieren. Dies lässt sich mit der hierarchisch strukturierten Organogenese einiger Gewebe wie zum Beispiel der Brustdrüse vergleichen, an deren Spitze sich Stammzellen befinden. Die Brustdrüse ist aus einem verzweigten System von Milchgängen aufgebaut. Die Gänge werden von einer kontraktilen basalen Schicht aus Myoepithelzellen und einer luminalen Schicht spezialisierter Epithelzellen gebildet. Durch Umbauvorgänge in der Brust zur Geburt, in der Pubertät und während der Schwangerschaft kann die Brustdrüse ihr Aussehen und ihre Funktion je nach Anforderung anpassen. Diese Wandelbarkeit wird durch Brustdrüsen-eigene Stammzellen gewährleistet. Gewebestammzellen zeichnen sich vor allem durch Selbsterneuerung und Multipotenz aus. Durch Selbsterneuerung können Stammzellen unendlich viele Teilungszyklen durchlaufen, ohne selbst dabei zu differenzieren. Dies wird durch eine asymmetrische Zellteilung garantiert: Eine Stammzelle teilt sich in eine Mutterzelle, die identisch zur ursprünglichen Zelle ist, und in eine Tochterzelle, die sich differenziert. Damit können neue Zellen generiert werden, ohne den Stammzellpool aufzubrechen. Die Eigenschaft der Multipotenz befähigt die Stammzellen, zu unterschiedlichen Zellen zu differenzieren. So wird die Heterogenität des Gewebes gewährleistet.<sup>10</sup> Die beiden Eigenschaften Selbsterneuerung und Multipotenz lassen sich auf die wenigen Zellen im Tumor, die den Tumor und alle ihn bildenden Zellen initiieren, übertragen. Somit haben die Tumor-initiierenden Zellen (TICs) und Stammzellen zwei fundamentale Gemeinsamkeiten, die die Vermutung zulassen, dass die Tumor-initiierenden Zellen (TICs) selbst Stammzellen sein können - sogenannte Krebsstammzellen (CSCs). Diese können entweder durch Akkumulation von Genmutationen aus gesunden Gewebestammzellen oder durch phänotypische Veränderungen aus Tumorzellen hervorgehen.<sup>6</sup>

Metastasen sind Sekundärtumore. Wenn man annimmt, dass Krebsstammzellen Entstehung, Wachstum und Differenzierung des Primärtumors generieren, ist es naheliegend, dass auch Zellen ähnlichen Charakters eine Metastase initiieren. Somit lässt sich vermuten, dass Metastasen-initiierende Zellen (MICs) auch Krebsstammzellen sein müssen.<sup>8</sup>

Neben Selbsterneuerung und Multipotenz zeichnen sich Stammzellen auch durch Langlebigkeit, erhöhte Resistenz gegenüber schädigenden Substanzen wie Zytostatika (unter anderem durch ABC-Transporter) und erhöhte Motilität (auf Grund ihres mesenchymalen Phänotyps) aus.<sup>10</sup> Übertragen auf die tumorigenen Zellen im Tumor, hat dies grundsätzliche Folgen für konventionelle Therapiestrategien.

## 1.5 EMT näher betrachtet

Während der Epithelial-Mesenchymalen Transition kommt es nicht nur zum morphologischen Wandel, sondern auch zu Veränderungen Epithel- beziehungsweise Mesenchym-spezifischer Differenzierungsmarker.<sup>11</sup> Um festzustellen, ob Zellen einen epithelialen oder mesenchymalen Charakter haben beziehungsweise eine EMT durchlaufen haben, ist es wichtig, einige Marker zu definieren. Dazu gehören unter anderem Signalwege, Transkriptionsfaktoren, Oberflächenproteine und Gewebe-spezifische Proteine.

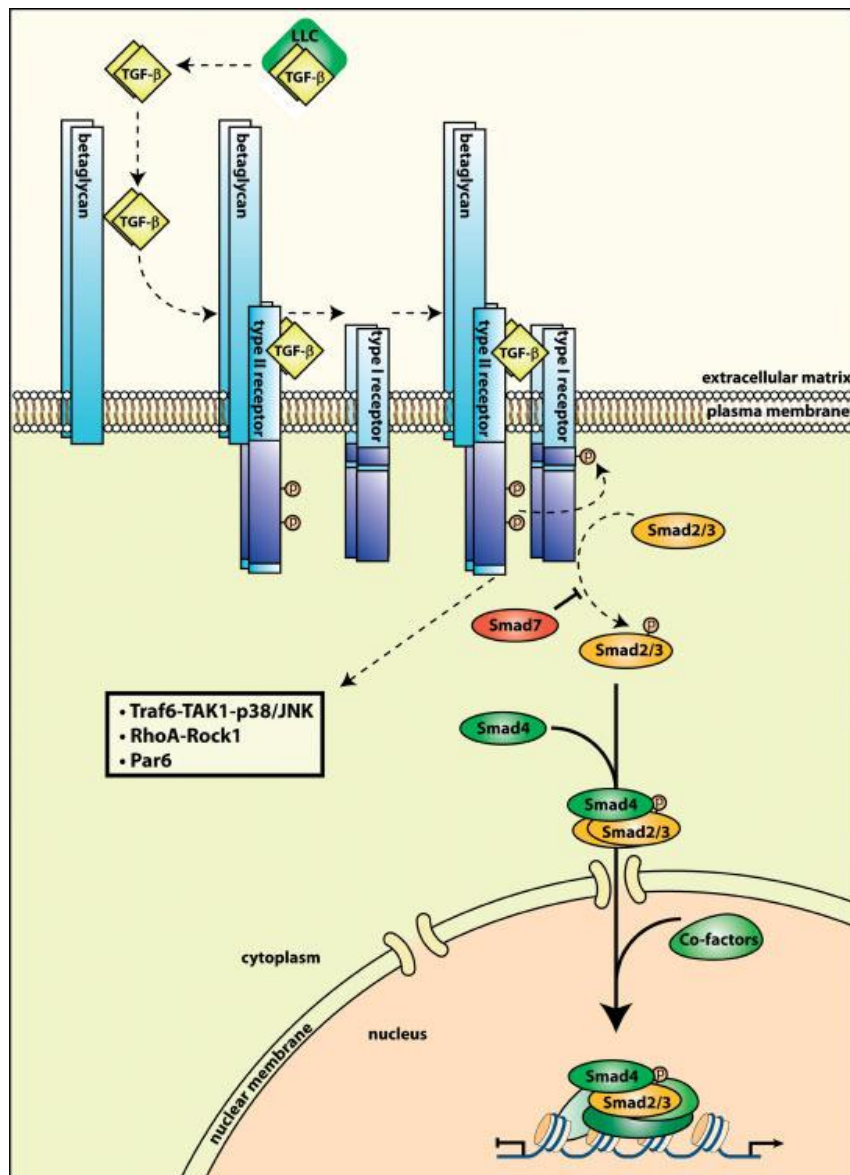
### 1.5.1 Signalwege und Transkriptionsfaktoren

Der Verlust beziehungsweise die Abnahme der E-Cadherin-Expression in Zellen scheint stark im Zusammenhang mit einer EMT zu stehen. E-Cadherin ist somit mitverantwortlich für den epithelialen Phänotyp.<sup>12</sup> E-Cadherine (E = epithelial, Cadherin = *Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesion molecules*;) sind Transmembranproteine der epithelialen Adhäsionskontakte, welche die Zellen im epithelialen Zellverband untereinander verbinden.<sup>13</sup> Die Expression von E-Cadherin wird unter anderem durch die beiden Transkriptionshemmer Snail und Slug reguliert. Snail und Slug gehören zur Familie der Zinkfingerproteine. Sie können über sogenannte Zinkfinger an DNA-Sequenzen binden und so als Transkriptionsfaktoren fungieren. ZEB1, ZEB2, Twist und Smad-Proteine sind weitere Transkriptionsfaktoren, die direkt oder indirekt an der Herabregulierung von E-Cadherin beteiligt sind. Alle genannten Transkriptionsfaktoren können unabhängig agieren, gleichzeitig aber auch unter dem Einfluss von Signalwegen stehen, die die EMT aktivieren.<sup>14</sup>

Die EMT-Signalwege sind sehr komplex. Viele der Signalwege überschneiden sich und können sich gegenseitig potenzieren. Am Ende werden die verschiedenen EMT-spezifischen Transkriptionsfaktoren aktiviert. Es spielen unter anderem die Signalwege TGF- $\beta$ , Wnt, Notch und Hedgehog eine wichtige Rolle.<sup>14</sup>

Der **TGF- $\beta$ -Signalweg** hat Einfluss auf Zellproliferation, -differenzierung, -apoptose, -adhäsion, -invasion und -interaktionen mit dem zellulären Mikromilieu. TGF- $\beta$  ist einer der

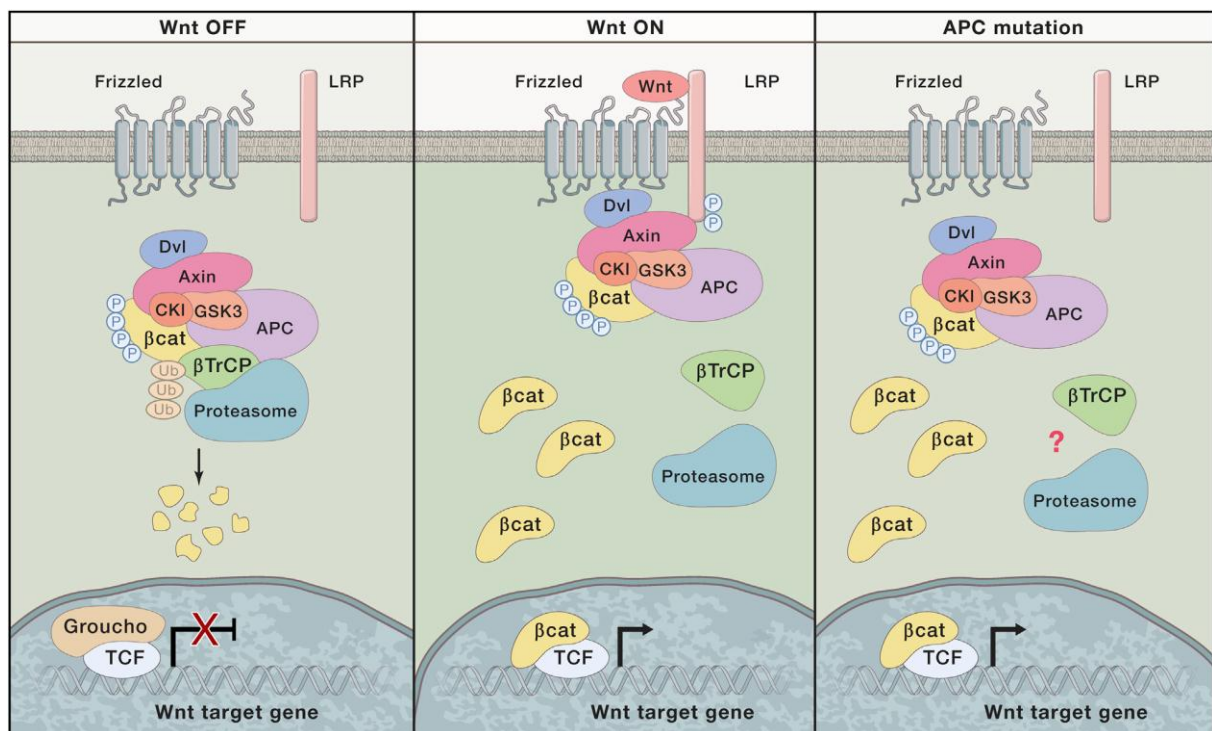
Hauptregulatoren physiologischer und pathologischer EMT. Physiologisch ist TGF- $\beta$  ein zytostatisches Zytokin, welches eine Unterbrechung des Zellzyklus bewirken kann. Gleichzeitig kann TGF- $\beta$  im Gegensatz dazu erhöhtes Zell-Überleben und Metastasierung in Tumorzellen hervorrufen. Dieses Phänomen wird als TGF- $\beta$ -Paradox bezeichnet. Im Tumor geraten die physiologischen und pathologischen Wirkungen von TGF- $\beta$  durch Mutationen aus dem Gleichgewicht, sodass letztere überwiegen. Man unterscheidet drei Formen von TGF- $\beta$  (1, 2 und 3). Sie werden als Homo- beziehungsweise Heterodimere in die Extrazellulärmatrix sezerniert. Aktiv wird TGF- $\beta$  erst nach Verlassen des Komplexes. Die TGF- $\beta$ -Rezeptoren sind Membran-gebundene Rezeptoren mit Serin-Threonin-Kinase-Aktivität. Man unterscheidet drei Rezeptoren (I, II und III). TGF- $\beta$  bindet als Ligand mit Unterstützung des TGF- $\beta$ -Rezeptor-III an den TGF- $\beta$ -Rezeptor-II. Diese Ligand-Rezeptor-Einheit bildet anschließend zusammen mit dem TGF- $\beta$ -Rezeptor-I einen neuen Komplex, wobei dieser phosphoryliert wird. Der aktivierte TGF- $\beta$ -Rezeptor-I (im Folgenden wird nur der kanonische Signalweg beschrieben) rekrutiert und phosphoryliert dann Smad 2 und 3. Diese bilden anschließend mit Smad 4 einen Komplex, der in den Nucleus wandert und dort als Transkriptionsfaktor agiert.<sup>14</sup>



**Abbildung 1** TGF- $\beta$  Signalweg, Abbildung von Meulmeester et al.<sup>15</sup>: TGF- $\beta$  in der Extrazellulärmatrix ist gebunden im "large latent complex". Bei der Freilassung interagiert das aktive TGF- $\beta$  schwach mit dem großen betaglycan Membranprotein, was viel stärker exprimiert wird als der TGF- $\beta$ RIII. Anschließend wird TGF- $\beta$  dem TGF- $\beta$ RII präsentiert, was wiederum zur Formation eines heterotetrameren Komplexes aus den Serin-Threonin-Kinasen TGF- $\beta$ RI und TGF- $\beta$ RII führt. Der dann aktive TGF- $\beta$ RII phosphoryliert (P) den TGF- $\beta$ RI. Dieser wiederum rekrutiert, phosphoryliert und aktiviert Smad Transkriptionsfaktoren (Smad2/3). Phosphorylierte Smad2/3 bilden einen Komplex mit Smad4, wandern dann in den Nucleus und bilden Transkriptionskomplexe mit zusätzlichen Co-Repressoren oder -Aktivatoren zur Regulation der Expression einer großen Breite an Genen. Das inhibitorische Smad (Smad7) reduziert weiteres „signalling“ durch die Inhibierung der Phosphorylierung von Smad2/3. Neben Smad „signalling“ aktiviert TGF- $\beta$  mehrere andere Signalkaskaden wie Traf6-TAK1-p38/JNK, RhoA-Rock1 und Par6.

Der **Wnt-Signalweg** ist ein bekannter Regulator für die Schicksalsentscheidung embryologischer Zellen und ein wichtiger Stammzellsignalweg. Wnt-Proteine sind interzelluläre Signalmoleküle, die bei Dysregulation eine EMT induzieren können. Das nachgeschaltete Effektorprotein des Wnt-Signalwegs ist  $\beta$ -Catenin. Bei inaktivem Wnt-Signalweg wird  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma durch GSK-3 $\beta$ , einer Kinase, gebunden und von

einem Zerstörungskomplex abgekapselt. Anschließend wird  $\beta$ -Catenin phosphoryliert beziehungsweise für den Abbau in der Zelle markiert. Unter diesen Bedingungen kann  $\beta$ -Catenin nicht im Zytoplasma akkumulieren. Durch Bindung von Wnt an seinen Frizzled Rezeptor entsteht ein Komplex, der  $\beta$ -Catenin aus seiner Bindung mit GSK-3 $\beta$  löst und somit seinen Abbau verhindert.  $\beta$ -Catenin kann dann in den Nucleus eindringen und zusammen mit anderen Molekülen einen Transkriptionsfaktor bilden.  $\beta$ -Catenin potenziert unter anderem Snail, Slug und Twist und beeinflusst somit indirekt die Expression von E-Cadherin. Durch die Minderung von E-Cadherin in den Zellen werden die Zelladhäsionskontakte abgebaut.  $\beta$ -Catenin ist zusätzlich Teil dieser Adhäsionskomplexe und wird beim Abbau dieser ins Zytoplasma freigesetzt. Somit kommt es zu einer Art Verstärkerkreislauf, wodurch den Wnt-Signalweg und den Verlust der Adhäsionskomplexe immer mehr  $\beta$ -Catenin anfallen.<sup>14</sup>



**Abbildung 2** Wnt Signalweg, nach Nusse et al.<sup>16</sup>: Links: In Abwesenheit eines Wnt Signals wird  $\beta$ -Catenin von einem Komplex aus Disheveled (Dvl), Axin, APC, Serin-Threonin-Kinasen GSK3 und CK1, Protein Phosphatase 2A (PP2A) und der E3 Ubiquitinligase  $\beta$ -TrCP degradiert.  $\beta$ -Catenin wird in der Folge phosphoryliert und ubiquitinyliert und anschließend durch das Proteasom abgebaut. Im Nucleus ist der T Zell Faktor (TCF) in einem inaktiven Zustand als Folge seiner Bindung an den Repressor Groucho. Mitte: Das Signal wird durch Wnt Liganden, die von Nachbarzellen sezerniert werden, initiiert. Durch die Bindung von Wnt an seine Rezeptoren Frizzled und LRP wird die Assoziation von Axin mit dem phosphorylierten Lipoprotein Rezeptor verwandten Protein (LRP) induziert. Der Destruktionskomplex zerfällt und  $\beta$ -Catenin wird stabilisiert, akkumuliert und bindet anschließend an TCF im Nucleus. Es kommt so zur Hochregulierung von Zielgenen. Rechts: Mutationen in APC unterbrechen den Destruktionskomplex und führen so ebenfalls zur Aktivierung des Signalwegs.

Ähnlich wie Wnt ist **Notch** unter anderem für die Embryogenese und die Schicksalsentscheidung der Zellen wichtig. Notch ist ein Transmembranrezeptor mit einer



extra- und intrazellulären Domäne für Ligandbindung und Signaltransduktion. Es gibt vier Varianten des Notch-Rezeptors (1, 2, 3 und 4). Zu den Notch-Liganden gehören die membrangebundenen Liganden der Delta und Jagged Familien. Der Notch-Signalweg wird durch die Bindung von Ligand und Rezeptor zweier benachbarter Zellen eingeleitet. Anschließend wird die intrazelluläre Domäne des Rezeptors ubiquitinyliert, wodurch dieser seine Konfiguration so ändert, dass er durch die ADAM Protease TACE gespalten werden kann. Durch eine  $\gamma$ -Sekretase kommt es zu einer weiteren Spaltung in der Transmembrandomäne des Rezeptors. Letztlich wird die Notch-Intrazellulär-Domäne (NICD) ins Zytoplasma freigesetzt. Sie gelangt in den Nucleus und agiert dort als Transkriptionsfaktor.<sup>14</sup>

Durch autoproteolytische Prozesse und Bindung zu Cholesterin entsteht aus dem **Hedgehog** Protein das Lipoprotein N-Terminal-Hedgehog-Fragment (HhN). Dieses bindet an den transmembranären Patched Rezeptor. Ungebunden bewirkt der Patched Rezeptor die Inhibition des Smoothed Proteins, eines ebenfalls transmembranären Rezeptors. Nach Aktivierung des Patched Rezeptors durch HhN kommt es zur Aktivierung des Smoothed Proteins in der Plasmamembran. Dieses wiederum aktiviert die Gli (glioma-associated oncogene family zinc finger) Transkriptionsfaktoren-Familie. Wie bei den oben beschriebenen Signalwegen kommt es zur Verstärkung weiterer EMT-spezifischer Transkriptionsfaktoren.<sup>14</sup>

### 1.5.2 Differenzierungsmerkmale für den epithelialen beziehungsweise mesenchymalen Phänotyp

Neben E-Cadherin ist ZO-1 (Zonula-Occludens-Protein-1) ebenfalls ein für Epithelien charakteristisches Protein. Es ist Teil der *Tight Junctions* beziehungsweise *Zonulae occludentes*, Barrierekontakte, die zwischen benachbarten Epithelzellen ausgebildet werden.<sup>13</sup>

EMT in Tumorzellen führt zur Herabregulierung von E-Cadherin. Gleichzeitig kann man feststellen, dass die Zellen im Gegenzug N-Cadherin verstärkt exprimieren. Dieses Phänomen wird als *Cadherin-Switch* bezeichnet. N-Cadherin befindet sich physiologisch unter anderem in der Herzmuskulatur, in Neuronen und in Fibroblasten. N-Cadherin bildet wie E-Cadherin Zell-Zell-Kontakte aus, allerdings sind diese weniger stabil. Es konnte gezeigt werden, dass N-Cadherin einen proinvasiven Effekt auf Tumorzellen hat. N-Cadherin ist somit ein Merkmal auf Tumorzellen, die durch EMT E-Cadherin vermindert exprimieren.<sup>17</sup>

Neben Zellkontakt-Proteinen, gibt es Gewebe-spezifische Intermediärfilamente, unter anderem Zytokeratinfilamente und Vimentin, welche ein passives Stützgerüst in den Zellen bilden. Während Zytokeratinfilamente Epithelzellen auszeichnen, findet man Vimentin in Zellen mesenchymaler Herkunft.<sup>13</sup>

## **1.6 Krebsstammzellen und Marker**

### **1.6.1 Oberflächenmarker**

Es konnte gezeigt werden, dass tumorigene Brustkrebszellen beziehungsweise Krebsstammzellen eine spezielle Oberflächenmolekül-Konstellation aufweisen:  $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ .<sup>9</sup> CD44 ist ein multistrukturelles und multifunktionales Zelloberflächenmolekül, das Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration und Angiogenese beeinflusst. Außerdem ist es an der Präsentation von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren gegenüber korrespondierenden Rezeptoren beteiligt. Zusätzlich spielt CD44 eine Rolle bei dem Andocken von Proteasen an der Zellmembran und bei Signalwegen für das Zellüberleben. All diese biologischen Eigenschaften sind essenziell für physiologische Aktivitäten normaler Zellen, sind aber auch mit den pathologischen Aktivitäten von Krebszellen assoziiert.<sup>18</sup> CD24 ist ein stark glykosyliertes Oberflächenprotein, das als Adhäsionsmolekül gilt. CD24 findet man in normalem und Krebs-erkranktem Brustgewebe vor allem bei terminal-differenzierten Epithelzellen luminalen Phänotyps.<sup>19</sup>

Die Expression der Oberflächenmoleküle CD44 und CD24 ist nicht ausreichend, um Krebsstammzellen hinlänglich zu beschreiben. Es wurden weitere Marker beschrieben, mit Hilfe welcher Krebsstammzellen vermeintlich, zusammen mit CD44 und CD24, genauer identifiziert werden können.

### **1.6.2 Signalwege**

Stammzell-typische Signalwege sind unter anderem Notch und Wnt. Beide Signalwege haben einen positiven Einfluss auf die Selbsterneuerungskapazität von Zellen. Auch die Hedgehog und TGF- $\beta$ 1-Signalwege sind bezeichnend für Stammzellen.<sup>6</sup> Bemerkenswert ist, dass diese Signalwege wie oben beschrieben auch eine wichtige Rolle für EMT spielen.

### **1.6.3 Funktionelle Eigenschaften**

Die Definition von Tumorigenität ist die Eigenschaft einer Tumorzelle, einen Tumor *in vivo* zu generieren. Dies konnte unter anderem durch Al-Hajj et al. getestet werden: Nach

Einsatz tumorigener Zellen in immunsupprimierte Mäuse kam es zur Tumorbildung.<sup>9</sup> Die *in vivo* Testung ist der Goldstandard für den Nachweis von Tumorigenität.<sup>20</sup>

Die Selbsterneuerungskapazität befähigt die Stammzellen *in vitro* zur Bildung von *spheres* in Zellsuspension im Rahmen einer 3D-Zellkultur. *Sphere*-Assays wurden zunächst zum Nachweis von neuronalen Stammzellen verwendet.<sup>21</sup> Inzwischen sind diese Assays auch zur Untersuchung von Brustkrebsstammzellen etabliert. *Spheres* ausgehend von Brustkrebsstammzellen werden auch als *mammospheres* bezeichnet.<sup>22</sup> Um zu gewährleisten, dass ein *sphere* tatsächlich aus einer Stammzelle hervorgeht und nicht das Aggregat mehrerer Zellen ist, sollte nur eine Tumorzelle pro *sphere*-Ansatz ausgesät werden. Alternativ kann man die Methode des *limiting Dilution* Verfahrens anwenden. Dabei wird eine Zellsuspension in mehreren Verdünnungsansätzen bis zu einer Grenzverdünnung herunterverdünnt, sodass letztlich statistisch gesehen nur noch eine Zelle in einem bestimmten Volumen vorhanden ist. Es konnte festgestellt werden, dass auch bei niedriger Zelldichte (1000 Zellen pro ml) im *sphere*-Ansatz die Klonogenität der *spheres* gegeben ist. *Spheres* sind ein *readout* für die Klonogenität und damit für die Selbsterneuerungsfähigkeit von Stammzellen *in vitro*.<sup>22</sup>

Stammzellen bilden bei Färbung mit dem Vitalfarbstoff Hoechst 33342 eine „*sidepopulation*“ (*SP*), also eine Nebengruppe. In der Regel bindet das fluoreszierende Färbemittel Hoechst 33342 an die DNA vitaler Zellen. Die Färbung korreliert so mit dem DNA-Gehalt der Zellen und kann Rückschlüsse auf den Zellzyklus geben. Stammzellen weisen einen erhöhten Efflux der Farbe auf, sodass ihr DNA-Gehalt mit dieser Methode nicht untersucht werden kann. Das Phänomen des erhöhten Effluxes kann man sich allerdings zu Nutze machen: Durch FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) können die Zellen mit geringerer Färbung identifiziert und sortiert werden.<sup>23</sup> Für den erhöhten Efflux der Farbe aus den Stammzellen macht man ABC(ATP-binding cassette)-Transporter verantwortlich. Als erstes wurde das *multidrug resistance* (MDR1) P-Glykoprotein, auch ABCB1 genannt, identifiziert. Es ist ein glykosyliertes Membran-assoziiertes Enzym, welches eine große Spanne diverser Substrate aus der Zelle exportiert. Desweiteren wurde das *breast cancer resistance* Protein (BCRP), auch ABCG2 genannt, beschrieben. Es ist wie P-Glykoprotein Membran-assoziiert.<sup>24</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> und *SP*-Zellen Resistenzen gegenüber Zystostatika zeigen.<sup>25</sup>

## 1.7 Stammzellen können durch EMT entstehen

Die Signalwege TGF- $\beta$ 1, Wnt, Notch und Hedgehog sind charakteristisch sowohl für die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften als auch für die Induktion von EMT in Zellen. Dies lässt die Vermutung anstellen, dass Stammzellen und EMT im Zusammenhang stehen. Durch die Induktion von EMT in nicht-tumorigenen, immortalisierten humanen Brustdrüsenepithelzellen mittels ektopischer Expression der Transkriptionsfaktoren Twist und Snail, konnten Mani et al. Zellen mesenchymalen Phänotyps generieren. Dabei wurde mittels FACS festgestellt, dass diese Zellen fast ausschließlich die Oberflächenmarker-Konstellation CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> aufwiesen.<sup>26</sup> Diese Konstellation wurde zuvor als Stammzell-Kriterium deklariert.<sup>9</sup> Außerdem konnten die Zellen nach vollzogener EMT 30 Mal mehr *mammospheres* bilden als die Kontrolle, was die Selbsterneuerungskapazität der Zellen nach EMT unterstreicht.<sup>26</sup> Es lässt sich damit ableiten, dass Zellen durch EMT möglicherweise zu Stammzellen werden können.

## 1.8 Weitere Marker

Zur sicheren Identifizierung von Stammzellen und Zellen, die EMT durchlaufen haben, sind weitere Biomarker nötig. Im Folgenden werden weitere Oberflächenmarker vorgestellt.

Das epitheliale Adhäsionsmolekül EpCAM, auch bekannt als ESA (Epithelien-spezifisches Antigen), ist schon seit längerem als Oberflächenmarker auf Zellen von epithelialen Primärtumoren identifiziert. Während es in gesundem Epithel gering vorkommt, wird es auf malignen Epithelzellen verstärkt exprimiert. Das *CellSearch*® System nutzt diese Beobachtung und detektiert mittels EpCAM zirkulierende Tumorzellen im Blut von Krebspatienten. So lassen sich die epithelialen Tumorzellen von den mesenchymalen hämatopoietischen Zellen im Blut abgrenzen.<sup>27</sup> Funktionell ist EpCAM ein Adhäsionsmolekül und ein Signalweg-Rezeptor, durch welchen die Onkogene myc und cyclin D1 aktiviert werden. EpCAM steht ferner im Zusammenhang mit Pluripotenz in embryonischen Stammzellen und der Umprogrammierung von differenzierten Zellen zu Stammzellen.<sup>28</sup> Es konnte gezeigt werden, dass EpCAM auf der Oberfläche der Tumorzellen während den verschiedenen Abschnitten der Metastasierung unterschiedlich exprimiert wird. EpCAM unterliegt somit einer dynamischen Expression: Während das Molekül auf den Oberflächen epithelialer Zellen im Primärtumor verstärkt vorhanden ist, wird es auf zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen vermindert exprimiert. Zellen in Metastasen exprimieren letztlich

wieder vermehrt EpCAM auf ihrer Oberfläche. Dies bedeutet, dass im Zuge von Epithelial-Mesenchymaler Transition EpCAM auf Tumorzellen herunterreguliert und *vice versa* mittels Mesenchymal-Epithelialer Transition wieder heraufreguliert wird.<sup>28</sup> Somit sind Krebsstammzellen, die durch EMT aus den epithelialen Zellen entstehen, nicht negativ für EpCAM, sondern exprimieren das Molekül vermindert. Es konnten  $CD44^{+}/CD24^{-/low}/ESA^{+}$ <sup>29</sup> beziehungsweise  $CD44^{+}/CD24^{-/low}/EpCAM^{low}$ <sup>30</sup> als tumorigene Krebsstammzellen identifiziert werden. Als festgestellt wurde, dass die Konstellation  $CD44^{+}/CD24^{-/low}$  nicht nur auf Krebsstammzellen sondern auch auf Primärtumorzellen des basalen Typs vorkommt, nutzte man EpCAM als Unterscheidungsmerkmal: Krebsstammzellen tragen EpCAM auf ihrer Oberfläche, während Basalzellen im Primärtumor negativ für EpCAM sind.<sup>30</sup> Möglicherweise kann EpCAM durch EMT auch vollständig auf der Oberfläche von CTCs beziehungsweise DTCs verschwinden.<sup>31</sup>

Zur Identifizierung von Metastasen-initiierenden Zellen unter zirkulierenden Tumorzellen, also von Krebsstammzellen, wurden die Biomarker CD47 und c-MET vorgestellt. Baccelli et al. zeigten, dass zirkulierende Tumorzellen mit der Oberflächenmolekül-Konstellation  $EpCAM^{+}CD44^{+}CD47^{+}c-MET^{+/-}$  nach Injektion in immunsupprimierte Mäuse, Metastasen generieren konnten.<sup>32</sup> CD47 und c-MET wurden somit vorwiegend auf CD44 exprimierenden zirkulierenden Brustkrebsstammzellen gefunden.<sup>33</sup>

CD47 ist ein auf Zellen weit verbreitetes Transmembranprotein. Es ist unter anderem mit dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  assoziiert und deshalb auch als Integrin-assoziiertes Protein bekannt. CD47 ist an der Modulation von Integrin-Funktionen wie Zelladhäsion, Phagozytose und zellulärer Migration beteiligt.<sup>34</sup> CD47 dient außerdem als Ligand für den SIRP $\alpha$ (Signal-regulierendes Protein Alpha)-Rezeptor, der auf Phagozyten wie Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird. Durch Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Signalkaskade, die letztlich die Phagozytose der CD47-exprimierenden Zelle unterbindet.<sup>35</sup> Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen vermehrt CD47 exprimieren und damit der Phagozytose durch das inerte Immunsystem entgehen.<sup>36</sup> Ferner tragen zirkulierende Tumorzellen im Vergleich zu den Zellen im Primärtumor vermehrt CD47 auf ihrer Zelloberfläche.<sup>37</sup> Dies konnte auch für zirkulierende und disseminierte Brustkrebszellen gezeigt werden. Hier korrelierte die vermehrte Expression von CD47 auf den CTCs beziehungsweise DTCs im Knochenmark mit einem schlechteren Krankheits-freien Überleben der PatientInnen.<sup>34</sup>

C-MET, auch als Hepatozyten-Wachstumsfaktor(HGF)-Rezeptor bekannt, ist ein Tyrosinkinaserzeptor. Er wird, wie der Name ableiten lässt, durch den Hepatozyten-

Wachstumsfaktor (HGF), auch *scatter* Faktor genannt, aktiviert. HGF wird vor allem in mesenchymalen Stromazellen produziert und wirkt parakrin auf Epithelzellen, die c-MET exprimieren.<sup>38</sup> HGF ist einer der Hauptwachstumsfaktoren, die „invasives Wachstum“, das heißt Motilität, Überleben und Proliferation, beziehungsweise Epithelial-Mesenchymale Transition induzieren.<sup>39</sup> Bei Aktivierung von c-MET kommt es zur Rezeptordimerisierung und Auto-Phosphorylierung, was zur Aktivierung mehrerer Signalkaskaden führt.<sup>33</sup> C-MET hat dabei unter anderem Einfluss auf Embryogenese, Wundheilung und Tumor Metastasierung - durch die Induktion von EMT.<sup>38</sup> Ferner bildet eine Isoform von CD44, CD44v6, einen ternären Komplex mit c-MET und HGF, der zur Aktivierung diverser Signalkaskaden führt. Interessanterweise ist zu erwähnen, dass die Abkürzung MET auch für Mesenchymal-epitheliale Transition steht, den reversiblen gegenteiligen Prozess von EMT.

Her2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2) beziehungsweise ErbB-2, ein Tyrosinkinaserzeptor, ist ein transmembranäres Protein und spielt eine Rolle beim Wachstum normaler Zellen. Der Rezeptor ist Teil der Familie der Her- beziehungsweise ErbB-Rezeptoren. Her2 aktiviert unter anderem die PI3K- (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und MAPK- (Mitogen-aktivierte Protein Kinase) Kaskaden.<sup>40</sup> Her2 ist in circa 25% primärer Tumoren der Brust überexprimiert und mit einem schlechten Krankheits-freien Überleben assoziiert. Außerdem korreliert eine Her2-Überexpression mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Zytostatika. Die Überexpression von Her2 auf der Zelloberfläche maligner Zellen wird auf eine Genamplifikation zurückgeführt.<sup>41</sup> In der Klinik als zielgerichtete Therapie für die Behandlung von Brustkrebs zugelassene anti-Her2-Antikörper sind unter anderem Trastuzumab (Herceptin®), Pertuzumab (Perjeta®) und Ado-Trastuzumab Emtansine (Kadcyla®). Ein weiteres gegen Her2 zugelassenes Medikament ist der Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib (Tykerb®).<sup>42</sup> Ferner konnten Magnifico et al. zeigen, dass Tumor-initiierende Zellen im Vergleich zu den restlichen Zellen in Her2-überexprimierenden Tumoren vermehrt Her2 auf ihrer Oberfläche tragen - und dies ohne Modifizierung der Her2-Genamplifikation. Diese Krebsstammzellen wiesen unter anderem eine bessere *mammosphere*-Bildungskapazität auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen Her2 und dem Notch-Signalweg gibt: Her2-überexprimierende Zellen weisen aktivierte Notch-Signalwege auf. Die Hemmung des Signalwegs durch einen  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor führte unter anderem zur Herunterregulation von Her2 und zur verminderten *mammosphere*-Bildung.<sup>43</sup>

## 1.9 Auswirkung zytostatischer Behandlung auf EMT und CSCs

Krebsstammzellen beziehungsweise Tumor-initiierende Zellen sind resistenter gegenüber konventionellen Therapien. Sie können zum Beispiel durch Zytostatika selektiert werden.<sup>44</sup> Man erklärt sich die Zytostatika-Resistenz unter anderem durch das verstärkte Vorhandensein von ABC-Transportern und der somit erhöhten Ausscheidung von Medikamenten aus den Zellen. Ferner sind Stammzellen weitestgehend „ruhende“ Zellen mit einem langsamen Zellzyklus, was sie zusätzlich widerstandsfähiger gegenüber zytotoxischen Substanzen macht. Des Weiteren können Krebsstammzellen auf Grund verstärkter DNA-Reparatur-Mechanismen besser die DNA-schädigende Wirkung ionisierender Strahlung abwehren.<sup>8</sup> Wie oben dargestellt können Zellen durch Epithelial-Mesenchymale Transition Stammzellcharakter gewinnen. Es wurde mehrfach beschrieben, dass EMT-Induktion und die dadurch erworbenen Stammzeleigenschaften in den Tumorzellen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Zytostatika führen.<sup>45</sup>

Resistenzen gegenüber Zytostatika spielen in der Brustkrebsbekämpfung eine große Rolle. Manche PatientInnen weisen von vornherein eine intrinsische Resistenz gegenüber Chemotherapie auf, was durch Stammzeleigenschaften von Zellen erklärt werden kann. Andere PatientInnen hingegen sprechen zunächst auf die Chemotherapie an, entwickeln im Laufe der Therapie aber eine Resistenz gegenüber dem Regime.<sup>45</sup> Dies lässt sich entweder dadurch erklären, dass durch Chemotherapie zwar der Großteil der Zellen angegriffen und zerstört wird, aber die eigentliche Tumor-initiierende Subpopulation selektiert wird, welche Zytostatika-resistent ist. Oder die Zellen werden unter Zytostatika-Behandlung erst resistent gegenüber dieser. Dies kann den Zellen durch phänotypische Veränderung gelingen: durch Epithelial-Mesenchymale Transition gewinnen sie Stammzeleigenschaften und die damit verbundene Widerstandsfähigkeit gegenüber zytotoxischer Substanzen. Es stellt sich dabei die Frage, ob Zytostatika an sich EMT in Zellen induzieren können. Können sich Zellen unter zytotoxischer Behandlung aus Überlebensdrang mittels Epithelial-Mesenchymaler Transition zu Tumorstammzellen umwandeln?

Jannasch et al. zeigten in einem rein murinen, syngenem Mausmodell, dass es nach der Standardchemotherapie mit Doxorubicin, Cyclophosphamid und 5-Fluorouracil *in vitro* und *in vivo* vermehrt zur Ausbildung mesenchymaler Tumorzellen kam. Dabei wurden Mauseigene Mammarkarzinomzellen in immunkompetente Mäuse implantiert. Es wurde festgestellt, dass die unbehandelten Kontrollen weniger disseminierte Tumorzellen aufwiesen als die mit Zytostatika behandelten Kontrollen. Des Weiteren konnte *in vitro* eine erhöhte Expression

EMT- und Stammzell-typischer Transkriptionsfaktoren verzeichnet werden. Somit ließ sich ableiten, dass durch zytostatische Behandlung EMT in den Tumorzellen induziert wurde. Gleichzeitig gewannen die Tumorzellen vermehrt Stammzeleigenschaften.<sup>46</sup>

Falls Zytostatika tatsächlich Epithelial-Mesenchymale Transition in den Zellen induzieren können, hätte dies grundlegende Folgen für die Klinik. Insbesondere neoadjuvante Therapien würden dann in Frage gestellt werden müssen. Durch die systemische Behandlung vor chirurgischer Entfernung des Primärtumors stehen wesentlich mehr Tumorzellen unter Chemotherapie als bei adjuvanter Therapie. Dies würde die Wahrscheinlichkeit für die EMT-Induktion in den Tumorzellen erhöhen, und damit auch das Risiko für Stammzellbildung, Tumorigenität und Mestastasenbildung.

### **1.10 Können Mammakarzinomzellen unter zytostatischer Behandlung *in vitro* dedifferenzieren?**

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch Zytostatika tatsächlich Epithelial-Mesenchymale Transition in Brustkrebszellen induziert werden kann und ob dadurch vermehrt Stammzellen entstehen. Dafür wurden *in vitro* Untersuchungen durchgeführt. Für die Versuche wurden die etablierten Mammakarzinomzelllinien BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 und die Standard-Zytostatika Epirubicin und Paclitaxel verwendet. Dabei wurden die Zellen unterschiedlichen Konzentrationen über unterschiedlich lange Zeiträume ausgesetzt. Das Ziel war, mittels Zytostatika Resistenzen in den Zellen gegenüber jene zu bewirken und anschließend mit Hilfe der in der Literatur beschriebenen Biomarker und Methoden zu messen, ob durch die zytotoxischen Substanzen EMT in den Zellen induziert wurde - unter der Annahme, dass durch EMT Krebsstammzellen entstehen und diese resistenter gegenüber Zytostatika sind. Zur Messung des Stammzell-Charakters der Zellen beziehungsweise der EMT-Vorgänge in den Zellen wurden die Methoden Westernblot, FACS und *sphere*-Assays angewendet. Mithilfe von Westernblots wurden dabei EMT-spezifische Proteine bestimmt und mittels FACS EMT- und Stammzell-spezifische Oberflächenmarker gemessen. Außerdem wurde mithilfe der *sphere*-Assays die Klonogenität der behandelten Zellen bestimmt, was ein *readout* für Stammzeleigenschaften von Zellen *in vitro* ist. Da bei diesem Versuchsaufbau sehr viele Zellen auf einmal behandelt wurden, kann der Versuchsaufbau, wenn auch nur entfernt, die neoadjuvante Chemotherapie im klinischen Setting widerspiegeln. Die Frage ist, ob durch Zytostatika-Behandlung induzierte Resistenz in Brustkrebszellen



vermehrt Zellen entstehen, die selbst Tumor generieren. Ist es möglich, dass Chemotherapie den Tumor einerseits zwar zerstört, ihn andererseits aber dennoch fördert?

## 2 Theoretische Grundlagen

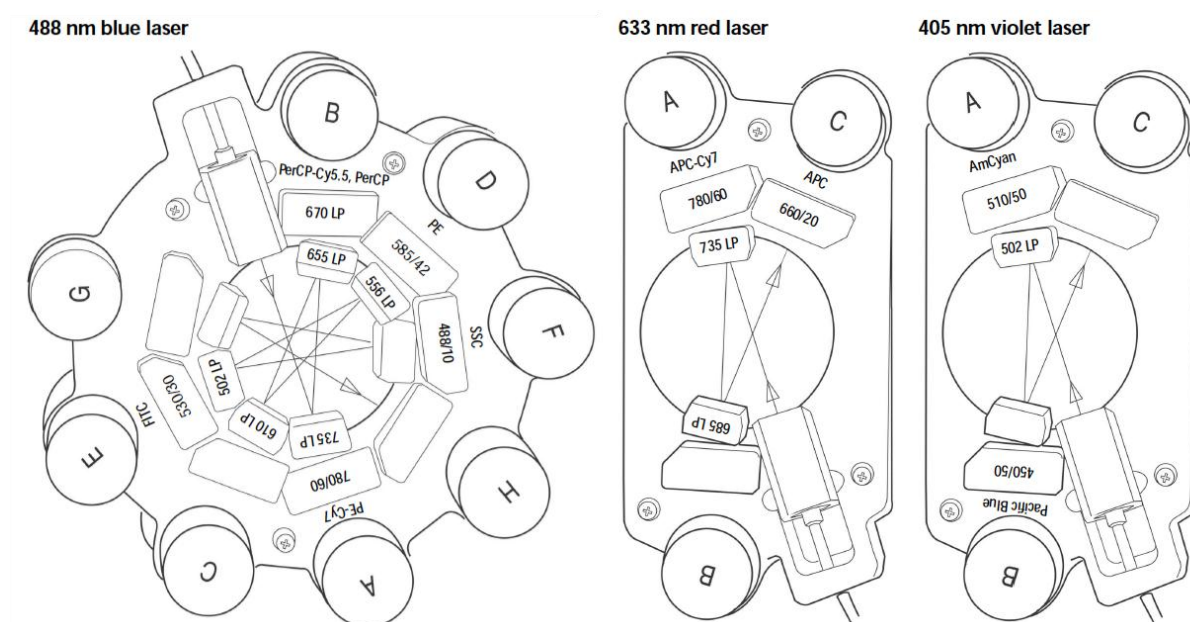
### 2.1 Durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik

#### 2.1.1 FACSCanto II

Mittels der Technik der Durchflusszytometrie lassen sich physikalische und biologische Eigenschaften von Zellen oder Zellkomponenten an Hand von Lichtstreuung und Fluoreszenz bestimmen. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem Gerät FACSCanto II der Firma BD Biosciences durchgeführt, wobei FACS die Kurzschreibweise für *Fluorescence Activated Cell Scanning* beziehungsweise *Sorting* darstellt.

FACSCanto II ist aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System und einer elektronischen Einheit aufgebaut. Das Flüssigkeitssystem wiederum besteht aus einer Trägerflüssigkeit und der Probenflüssigkeit. Durch laminaren Fluss wird verhindert, dass sich die beiden verschiedenen Flüssigkeiten vermischen. Die suspendierten Zellen in der Probenflüssigkeit durchlaufen eine Durchfluss-Küvette wie an einer Perlenschnur aufgereiht („Hydrodynamische Fokussierung“). Während dieses Vorgangs passieren die Zellen einzeln rechtwinklig die Strahlengänge dreier hintereinandergeschalteter Laser. Den Ort, an welchem die Zelle vom Strahl des Lasers getroffen wird, bezeichnet man als Illuminationspunkt. Die von dort entsandte Strahlung wird – je nach Größe und Granulation der Zelle – in einem *Forward Scatter* (FSC, Vorwärtsstreulicht) und einem *Side Scatter* (SSC, Seitwärtsstreulicht) detektiert. Das *Forward Scatter* wird durch eine Photodiode digitalisiert und repräsentiert die Größe der Zellen. Das *Side Scatter* wird in einem Winkel von 90° reflektiert und bringt Aufschluss über die Granulierung und Zusammensetzung der Zelle. Es wird zusammen mit dem von der Zelle emittierten Fluoreszenzlicht in die Photodetektionseinheit geleitet. Neben SSC und FSC kann im FACS-Gerät auch die fluoreszierende Strahlung gemessen werden. Dazu werden die Zellen vorab mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt. Die drei Laser des FACSCanto II entsenden Licht unterschiedlicher Wellenlänge – blaues Licht mit 488 nm, rotes Licht mit 633 nm und violettes Licht mit 405 nm – und regen so Farbstoffe in unterschiedlichen Wellenbereichen an, was dazu führt, dass diese Photonen absorbieren, angeregt werden und im Anschluss daran Strahlung größerer Wellenlänge (Fluoreszenzlicht) emittieren.<sup>47</sup> Dieses Licht wird dann mittels eines dem jeweiligen Laser zugehörigen Glasfaserkabels in die jeweilige Photodetektionseinheit geleitet: ein Oktagon für die blauen und je ein Trigon für die roten und die violetten Lasersignale. Die Einheiten haben unterschiedlich viele sogenannte *Photomultiplier Tools (PMTs)*, die neben der Detektion das

Fluoreszenzlicht in elektrische Signale umwandeln. Das Oktagon besitzt fünf PMTs, wobei ein PMT die SSC-Signale erhält. Die Trigone enthalten je zwei PMTs. Dieser Aufbau der Photodetektionseinheiten wird auch als 4-2-2-Konfiguration des FACSCanto II bezeichnet: es kann pro Messung Licht maximal acht verschiedener Wellenlängen detektiert werden – im Oktagon vier und je zwei in den beiden Trigonen.



**Abbildung 3** 4-2-2 Konfiguration der Photodetektionseinheiten im FACSCanto II. Das Licht des blauen Lasers wird in das Oktagon geleitet. Das Licht des roten beziehungsweise violetten Lasers in jeweils ein Trigon.<sup>48</sup>

In den Photodetektionseinheiten wechseln sich Filter und Spiegel ab, sodass das Licht spezifischer Wellenlänge seinen zugeordneten PMT trifft. Am Beispiel des Oktgons (s. Abbildung 3): tritt das Licht in die Photodetektionseinheit ein (s. eingezeichneter Pfeil in Abbildung 3) wird zunächst das Licht größter Wellenlänge ( $\lambda > 735$  nm) gefiltert und zum passenden PMT (780/60) geleitet. Das restliche Licht mit kleinerer Wellenlänge ( $\lambda < 735$  nm) wird von einem Spiegel reflektiert und gelangt zum nächsten Filter, der Licht mit der Wellenlänge größer 655 nm passieren lässt, Licht mit kleinerer Wellenlänge wird wieder reflektiert. Nach diesem Prinzip wird das Licht weiter gefiltert und reflektiert bis am Ende das Licht in unterschiedliche Wellenlängen aufgetrennt werden und zu den entsprechenden PMTs gelangen kann. Ein Teil des Lichts erreicht ungefiltert am Ende das letzte PMT, an welchem das SSC-Signal detektiert wird.<sup>49</sup>

### 2.1.2 Multicolor Assays

Die durch die 4-2-2-Konfiguration der optischen Einheit mögliche gleichzeitige Messung von acht verschiedenen Farben wurde für die fluoreszenzanalytischen Versuche

dieser Arbeit genutzt. Es wurden Sechsfarb-Analysen, sogenannte Multicolor Assays, durchgeführt.

Instrument	Laser	Excitation Laser Line (nm)	Fluorescence Channel	Fluorochromes provided by BD Biosciences			
BD FACSCanto II flow cytometry system	Solid State (L1)	488	Green	FITC	Alexa Fluor® 488		
			Yellow	PE	PI		
			Orange	BD Horizon™ PE-CF594	PE-Texas Red®		
			Red	7-AAD	PE-Cy™5	PerCP	PerCP-Cy™5.5
			Infrared	PE-Cy™7			
	HeNe (L2)	633	Red	APC	Alexa Fluor® 647		
			Far Red	Alexa Fluor® 700			
			Infrared	BD APC-H7	APC-Cy7		
	Violet (L3)	405	Green	BD Horizon™ V500	AmCyan		
			Blue	Brilliant Violet™ 421	BD Horizon™ V450	VPD450	Pacific Blue™

**Abbildung 4** Emissionsspektren der gewöhnlich verwendeten Fluorochrome durch Anregung der verschiedenen Laser des FACSCanto II.<sup>49</sup>

Die obige Tabelle zeigt die verschiedenen Fluoreszenzkanäle (*Photomultiplier Tools* der Detektionseinheiten) der drei Laser des FACSCanto II. Für jeden Fluoreszenzkanal eines Lasers sind mögliche Fluorochrome gelistet, deren Emissionslicht nach Anregung durch den jeweiligen Laser von dem zugehörigen PMT im Fluoreszenzkanal des Lasers detektiert wird. Es wird deutlich wie verschiedene Farben mit gleichem Absorptionsspektrum (zum Beispiel 488 nm) aber individuellem Emissionsspektrum (zum Beispiel grünes Licht des Farbstoffs FITC und infrarotes Licht des Farbstoffs PE-Cy7) gleichzeitig in einer Detektionseinheit gemessen werden können. Pro Laser und Kanal kann nur ein zugehöriges Fluorochrom erfasst werden, weil es sonst zu einer Überlagerung der Emissionsspektren in einem PMT kommen würde. Durch Nutzung von drei Lasern zur selben Zeit können zusätzlich weitere Farben gemessen werden: zum Beispiel kann die rote Fluoreszenzfarbe gleichzeitig in der Detektionseinheit des blauen und des roten Lasers gemessen werden, wenn je ein Fluorochrom mit einer Absorptionswellenlänge von 488 nm beziehungsweise 633 nm eingesetzt wird.

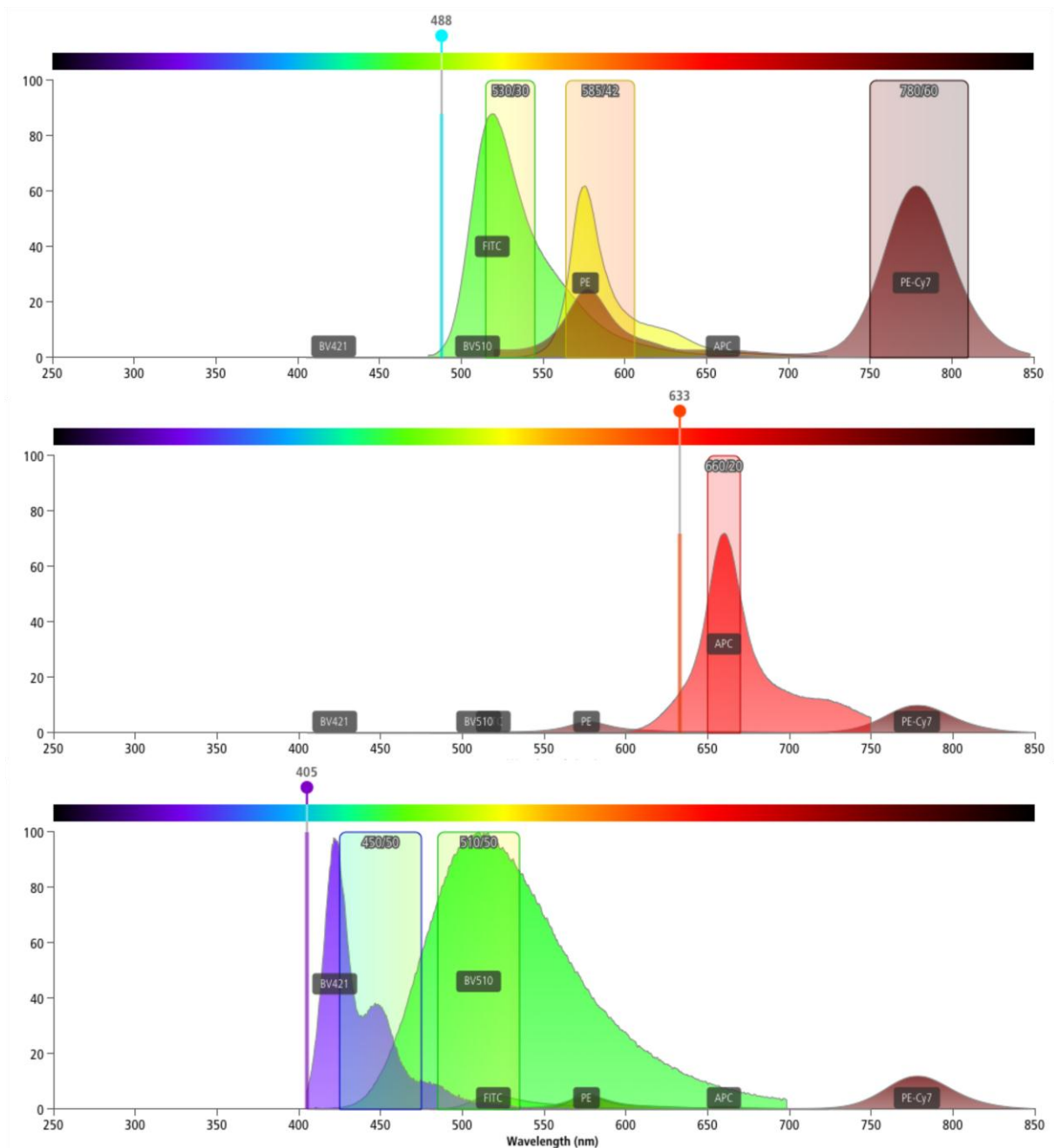
In obiger Tabelle sind auch Tandem-Farben wie zum Beispiel PE-Cy7 gelistet. Sie funktionieren auf dem Prinzip von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). Wenn das Donor-Fluorochrom eines Tandem-Farbstoffs angeregt wird, transferiert es durch FRET die Energie auf ein Akzeptor-Fluorochrom, was dazu führt, dass die Wellenlänge des Akzeptor-Fluorochroms emittiert wird.<sup>50</sup>

Für die Messungen in dieser Arbeit wurden sechs verschiedene an Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe verwendet (s. Tabelle 2).

**Tabelle 2** Für diese Arbeit verwendete Fluorochrome.

Antikörper	Laseranregung (nm)	Fluoreszenzkanal	Fluorochrom
Anti-Her2	488	Grün	FITC
Anti-CD47	488	Gelb	PE
Anti-CD44	488	Infrarot	PE/Cy7
Anti-c-MET	633	Rot	APC
Anti-CD24	405	Grün	BV510
Anti-EpCAM	405	Blau	BV421

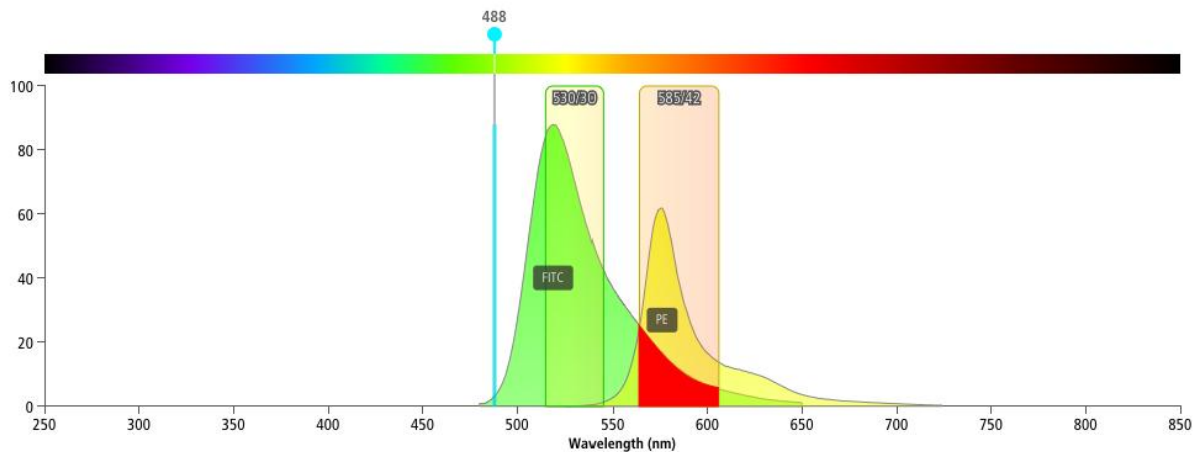
Die verwendeten Farbstoffe zeigen bei den vorhandenen Lasern folgendes Emissions- und Überlappungsspektrum auf.



**Abbildung 5** Emissionsspektren der in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome, angeregt durch den jeweiligen Laser des FACSCanto II. Außerdem dargestellt: Filter der PMTs in den Photodetektionseinheiten und die teilweise Überlappung der Emissionsspektren. Erstellt durch *BD Spectrum Viewer a Multicolor Tool*.<sup>51</sup>

### 2.1.2.1 Spillover und Compensation

Das Phänomen des Spillovers kann bei Koexistenz mehrerer Marker auf einer Zelle auftreten. Als Spillover wird die physikalische Überlappung von Emissionsspektren bezeichnet. Es tritt immer dann auf, wenn die Fluoreszenz-Emission eines Fluorochroms in einem Detektor erfasst wird, der eigentlich das Signal eines anderen Fluorochroms detektieren soll. In Abbildung 6 kommt es zum Spillover von FITC in den Fluoreszenzkanal von PE.



**Abbildung 6** Spillover (rot eingezeichnet) des FITC Emissionsspektrums in den PMT, der eigentlich die Emission des PE-Fluorochroms misst. Angeregt werden die beiden Fluorochrome durch den blauen Laser. Erstellt durch BD Spectrum Viewer a Multicolor Tool.<sup>51</sup>

Da sich bei einem Multicolor Assay von sechs Farben Spillovers nicht vermeiden lassen, was Abbildung 5 und Abbildung 6 zeigen, musste vor den Messungen für diese Arbeit eine *Compensation* mit Hilfe der FACSDiva™ Software durchgeführt werden, was ein essenzieller Teil des experimentellen Setups für Multicolor Assays ist. Die Menge an Spillover eines Fluorochroms in den Messbereich eines anderen Fluorochroms kann als lineare Funktion berechnet und durch Kompensation korrigiert werden. Wird die Kompensation nicht korrekt durchgeführt, kann die Interpretation der Daten sehr schwierig bis unmöglich werden.<sup>50</sup> Das primäre Ziel der Kompensation ist es, das Signal eines Fluorochroms aus allen Nachbarkanälen, in denen es zusätzlich detektiert wird, zu entfernen.

Im Folgenden soll beschrieben werden, wie die Kompensationskontrollen für das 6-Farb-Assay in der FACSDiva™ Software durchgeführt wurden. Die Kompensationkontrollen müssen durch Einzelfärbungen eingerichtet werden. Das heißt für jedes verwendete Fluorochrom müssen einzeln-gefärbte Kompensationskontroll-Röhrchen vorbereitet werden. Diese werden nacheinander gemessen, wobei jede Farbe in allen verwendeten Fluoreszenzkanälen registriert wird. Sind die Positivkontrollen „off-scale“ oder hat die Negativkontrolle eine zu hohe Autofluoreszenz, kann man die PMT-Verstärkerspannung (Voltage) entsprechend rauf- oder runterregulieren. Nachdem alle Positiv- und Negativkontrollen gemessen wurden, gibt man den Befehl „*Calculate Compensation*“ und die Software errechnet die notwendige Kompensation. Folgende Tabelle zeigt die Einzelfärbungen und welches Material oder welcher Zelltyp für die Färbung verwendet wurden – die Positivkontrollen exprimieren den gefärbten Marker stark auf ihrer Oberfläche und können so ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal für das Kompensations-Setup generieren.

**Tabelle 3** Für die Compensation des Multicolor Assays verwendete an Antikörper gekoppelte Fluorochrome und das gefärbte Material.

Tube	Färbung	Zelltyp/ Material
1	Keine Färbung (Autofluoreszenz, Negativkontrolle)	JIMT-1
2	Anti-Her2-FITC	SK-BR-3
3	Anti-CD24-BV510	SK-BR-3
4	Anti-CD44-PE-Cy7	JIMT-1
5	Anti-EpCAM-BV421	SK-BR-3
6	Anti-CD47-PE	Vollblut
7	Anti-MET-APC	JIMT-1

Zu beachten ist aber, dass in manchen Fällen die Spillovers nur bedingt kompensiert werden können. Dies ist der Fall, wenn das Fluorochrom, das in den Nachbarkanal strahlt, wesentlich stärker fluoresziert als das eigentliche Fluorochrom des Kanals. Der Grund dafür kann zum Beispiel sein, dass die intrinsische Leuchtkraft des nicht Spillover-Verursachers sehr viel schwächer ist als die des Spillover-Verursachers oder dass das mit dem Farbstoff-markierte Antigen zu wenig dicht auf den zu messenden Zellen exprimiert ist. Außerdem ist das Verhältnis Fluorochrom zu Antikörper nicht normiert, was Einfluss auf die Fluoreszenz der gefärbten Zelle haben kann.

#### 2.1.2.2 FACS-Einstellungen für die 6-Farb-Assays nach vollzogener Compensation

Parameter, Fluorochrom	Voltage am PMT
FSC	0
SSC	209
FITC	320
BV510	320
PE-Cy7	470
BV421	239
PE	310
APC	530

Threshold Parameter	Threshold
FSC	2000

Fluorochrome (Fluorochrom - messender PMT)	Kompensationswerte in Prozent (%)
BV510 - FITC	1,88
PE-Cy7 - FITC	0,43
BV421 - FITC	3,94
PE - FITC	27,44
APC - FITC	0,00
FITC - BV510	0,00
PE-Cy7 - BV 510	0,00
BV421 - BV 510	35,31
PE - BV 510	0,00



APC - BV 510	0,00
FITC - PE-Cy7	0,02
BV510 - PE-Cy7	0,00
BV421 - PE-Cy7	0,00
PE - PE-Cy7	0,22
APC - PE-Cy7	0,00
FITC - BV421	0,00
BV510 - BV421	4,89
PE-Cy7 - BV421	0,00
PE - BV421	0,00
APC - BV421	0,00
FITC - PE	0,00
BV510 - PE	0,00
PE-Cy7 - PE	4,00
BV421 - PE	0,00
APC - PE	0,00
FITC - APC	0,01
BV510 - APC	0,00
PE-Cy7 - APC	0,27
BV421 - APC	0,00
PE - APC	0,00

### 2.1.2.3 Stain Index

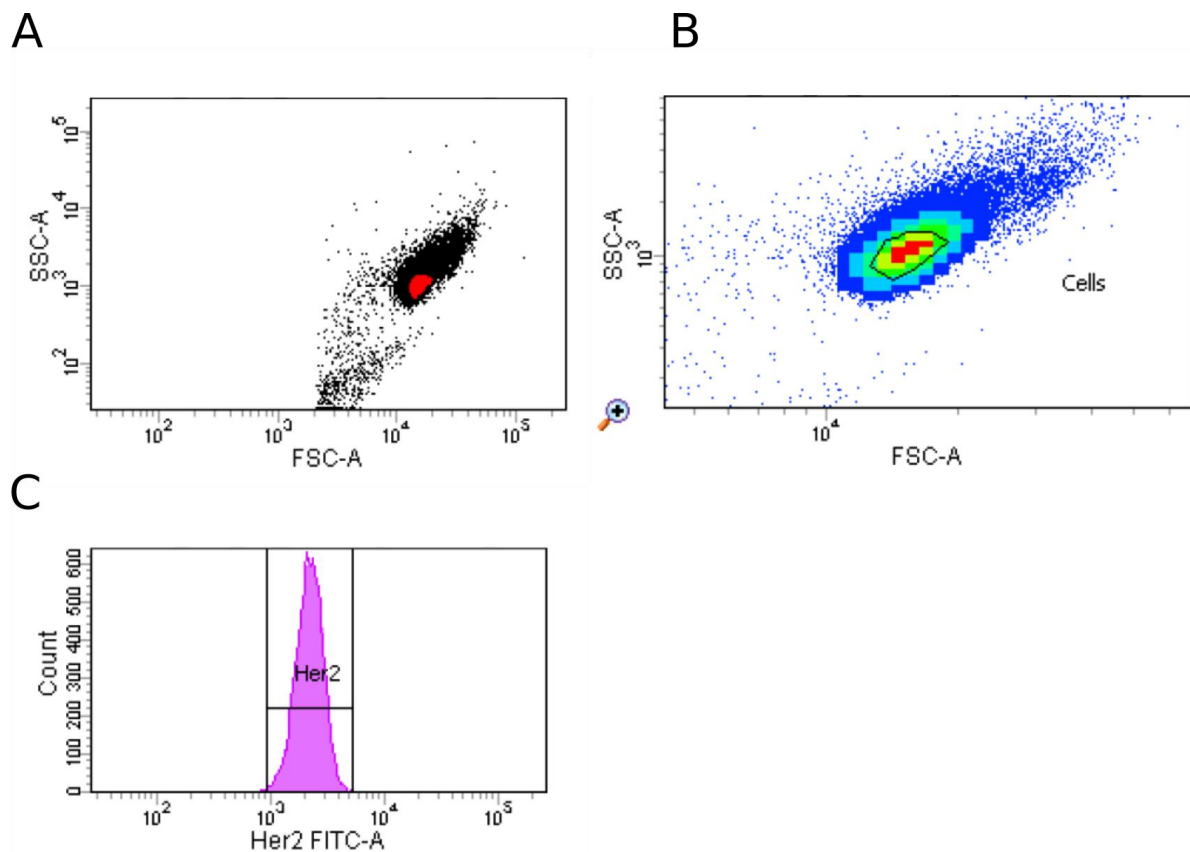
Die reine Fluoreszenz eines Fluorochroms kann mittels der Beziehung zwischen positiver und negativer (Hintergrund-)Signale errechnet werden. Hintergrundsignale, die vom Detektor erfasst werden, sind zum Beispiel die Autofluoreszenz einer Probe oder die unspezifische Antikörperbindung an die Oberfläche der gefärbten Zellen. Mit Hilfe des sogenannten Stain-Index werden diese Hintergrundsignale berücksichtigt. Dafür müssen die zu messenden Zellen nicht nur mit den sechs Antikörpern aus dem 6-Farb-Assay gefärbt werden, sondern zusätzlich als Kontrolle dazu in einem separaten Tube mit Isotyp-Antikörpern der gleichen Farben (also Antikörpern ohne spezifische Bindung) inkubiert werden. So können die falsch-positiven Signale, verursacht durch die Autofluoreszenz der verwendeten Zellen und die unspezifische Bindung der eigentlich spezifischen Antikörper an die Oberfläche der verwendeten Zellen, aus dem resultierenden Fluoreszenzsignal herausgerechnet werden. Der Stain-Index wird wie folgt berechnet<sup>52</sup>:

$$\text{Stain Index} = \frac{(MFI_{\text{Stain}} - MFI_{\text{Isotype}})}{2 \cdot SD_{\text{Isotype}}}$$

### 2.1.2.4 Datendarstellung und -verarbeitung

Mittels Dot- oder Densityplot können zwei gemessene Parameter dargestellt werden. Hierbei kann man zum Beispiel SSC auf der y- und FSC auf der x-Achse gegenüberstellen.

Dabei kann man nicht nur vitale Zellen identifizieren, sondern diese auch von Debris (Zelltrümmern) und Zelldubletten beziehungsweise -aggregaten abgrenzen. Das FSC- und SSC-Signal des Debris beziehungsweise der Dubletten und Aggregate sind wesentlich kleiner beziehungsweise größer als die gemessenen Signale der intakten Einzelzellen. Durch gezielte *Gate*-Setzung kann man die Subpopulation der gefärbten Einzelzellen isoliert betrachten und dann die Expression der einzelnen Marker des 6-Farb-Assays bewerten. Dafür trägt man Histogramme auf, die auf der x-Achse die Fluoreszenz einer der sechs Parameter und auf der y-Achse die Anzahl der gemessenen Ereignisse angeben.



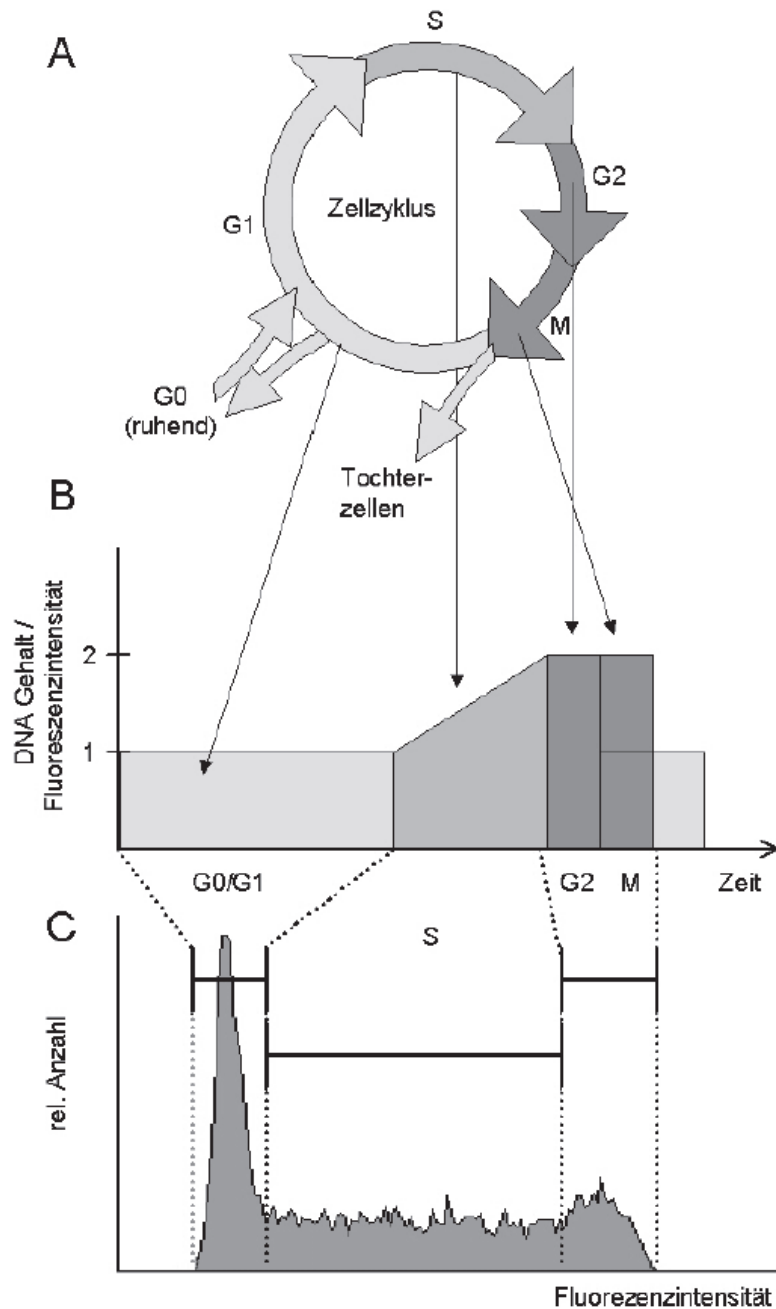
**Abbildung 7** Dotplot, Densityplot und Histogramm in der FACSDiva™; logarithmische Darstellung; gemessen wurden unbehandelte BT-474-Zellen. A: Dotplot mit Threshold bei 2000 Ereignissen im FSC. B: Gezoomter Densityplot mit *Gate*-Setzung zur Erfassung von Einzelzellen. C: Beispielhaft dargestelltes Histogramm zur Erfassung der Her2-Expression auf den Zellen, die im Densityplot durch das *Gate* erfasst wurden.

Alle 6-Farb-Assays wurden mit Hilfe der Software FACSDiva™ Version 6.1.1 durchgeführt. Die Daten wurden als .fcs Datei gespeichert und als .pdf Datei exportiert.

### 2.1.3 Proliferationsanalysen

Durch Fluoreszenz kann auch die Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation bestimmt werden, indem Fluoreszenzfarbstoffe quantitativ mit der DNA wechselwirken. Zellzyklusanalysen können Rückschlüsse auf die Zellproliferation geben, wobei mittels einer

statischen Analyse die prozentuale Verteilung einer Zellpopulation auf die G1-, S- und G2/M-Phase des Zellzyklus mit Hilfe der Fluoreszenzintensität bestimmt wird. Zu diesem Zweck wird die DNA der Zellen mit einem speziellen Farbstoff gefärbt – für die Messungen in dieser Arbeit wurde dafür 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) verwendet, ein Farbstoff, der präferiert mit AT- beziehungsweise GC-Basenpaaren wechselwirkt und vom violetten Laser des FACSCanto II angeregt wird.<sup>53</sup> Da DAPI an alle doppelsträngigen Nukleinsäuren in der Zelle bindet, wurde vor der Färbung mittels Zugabe von RNase die RNA in den Zellen verdaut. Um die Zellen permeabel für RNase und DAPI zu machen, wurden diese vorweg in Methanol fixiert.

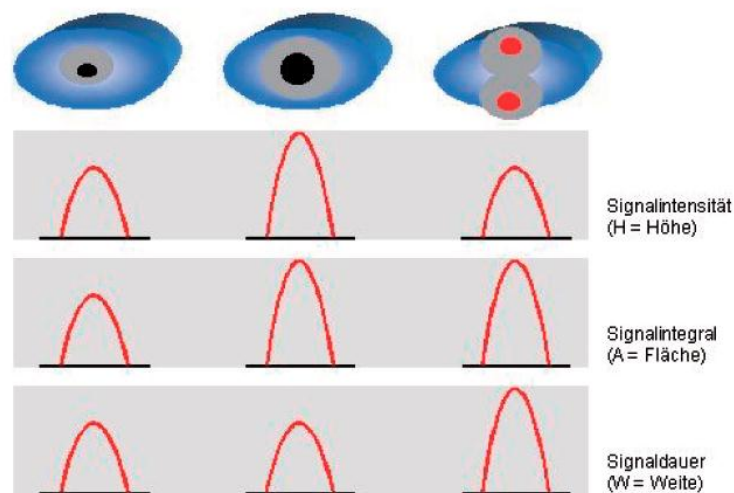


**Abbildung 8** A: Zellzyklus-Schema mit G1-, S-, G2- und M-Phase; ruhende Zellen befinden sich in der G0-Phase; B: Sich in G0- beziehungsweise G1-Phase befindende Zellen weisen einen einfachen DNA-Gehalt auf, während der S-Phase wird dieser verdoppelt, sodass Zellen kurz vor der Zellteilung in der G2- beziehungsweise M-Phase einen doppelten DNA-Gehalt haben; der DNA-Gehalt korreliert direkt mit der im FACS gemessenen Fluoreszenzintensität. C: Die verschiedenen Zellzyklus-Phasen dargestellt in einem DNA Histogramm; auf der x-Achse lässt sich die Fluoreszenzintensität beziehungsweise der DNA-Gehalt und damit die Zellzyklus-Phase ablesen, die y-Achse erfasst die Anzahl der gemessenen Zellen.<sup>53</sup>

In Abbildung 8 ist zu sehen, wie die einzelnen Phasen des Zellzyklus in einem Durchflusszytometer-DNA-Histogramm dargestellt werden. Sich in der G1-Phase befindende Zellen weisen im Normalfall einen einfachen diploiden Chromosomensatz auf, der in der S-Phase verdoppelt wird, sodass die Zellen letztlich kurz vor der Zellteilung in der G2-Phase

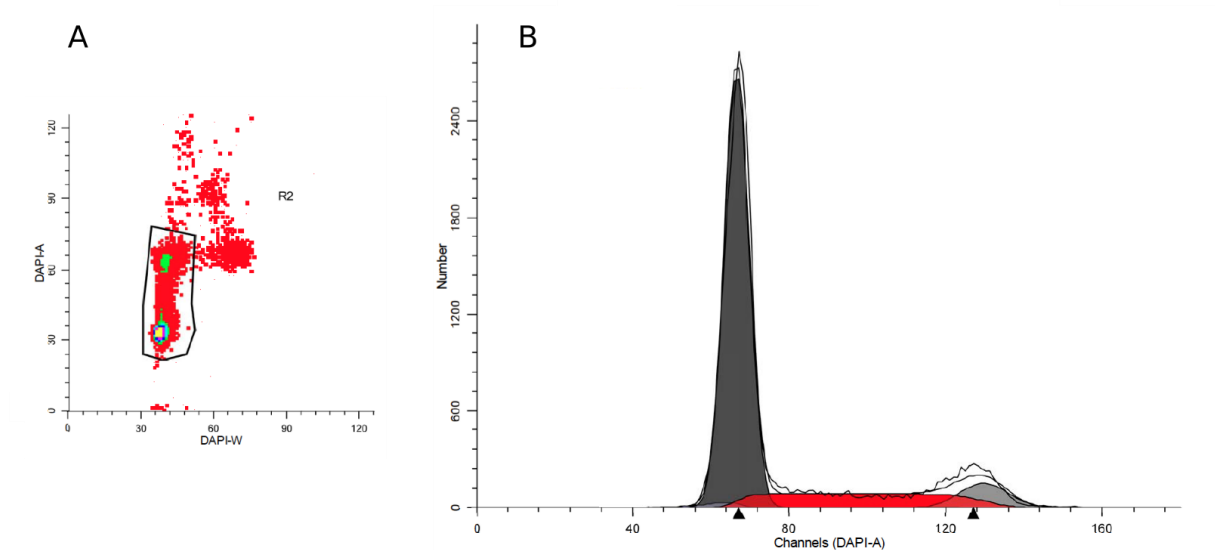
einen zweifachen Chromosomensatz besitzen. Dem sogenannten DNA-Histogramm kann man entnehmen, welcher Anteil der Zellpopulation sich je in der G1-, S- oder G2-Phase befindet. Da die G1-Phase des Zyklus die längste Phase darstellt, ist sie normalerweise die am häufigsten vertretene Gruppe einer Zellpopulation.<sup>53</sup>

Für die Diskriminierung von Zelldubletten gegenüber Einzelzellen kann man sich der Pulsprozessortechnologie bedienen. Passiert ein Partikel den Illuminationspunkt eines Lasers im FACS-Gerät, gibt dieses einen Puls ab. Dieser Puls in Form einer Kurve ist durch seine Signalintensität (Höhe der Kurve), seinen gesamten „Fluoreszenzgehalt“ (Integral der Fläche unter der Kurve) und seine Partikelgröße beziehungsweise Signaldauer (Weite der Kurve) definiert.



**Abbildung 9** Darstellung wie anhand von Signalintensität, Signalintegral und Signaldauer eine Einzelzelle mit doppeltem DNA-Gehalt von einer Dublette bestehend aus zwei Einzelzellen mit je einfachem DNA-Gehalt unterschieden werden kann.<sup>53</sup>

Einzelzellen in der G1-Phase haben einen einfachen Chromosomensatz, somit haben sie ein einfaches Signalintegral und eine einfache Signaldauer. Einzellzellen in der G2-Phase haben auf Grund ihres doppelten DNA-Gehalts auch eine erhöhte Signalintegral, die Signaldauer bleibt gleich. Dubletten, in Abbildung 9 zwei G1-Zellen, haben eine längere Signaldauer, da sie durch ihre Partikelgröße mehr Zeit brauchen, um den Illuminationspunkt des Lasers zu passieren. Ihr „Fluoreszenzgehalt“ entspricht - da die G1-Dubletten zusammen auch einen doppelten DNA-Gehalt haben - dem der G2-Einzelzellen.<sup>53</sup>



**Abbildung 10** Densityplot und DNA-Histogramm in der Software ModFit; gemessen wurden unbehandelte BT-474 Zellen. A: Densityplot mit *Gate*-Setzung um Einzelzellen mit einfachem beziehungsweise doppeltem DNA-Gehalt; Zelldubletten beziehungsweise Aggregate sind damit ausgeschlossen; B: DNA-Histogramm mit G1- (dunkelgrau), S- (rot) und G2/M- (hellgrau) Phase.

Wenn man in einem Densityplot die Fläche (A=Area) gegen die Weite (W) aufträgt, kann man anhand von Größe (einfache Größe) und DNA-Gehalt (einfacher und zweifacher DNA-Gehalt), die Einzelzellen heraus-„gaten“ und in einem DNA-Histogramm darstellen (s. Abbildung 10).

### 2.1.3.1 Datendarstellung und -verarbeitung

Alle durchflusszytometrischen Proliferationsmessungen wurden wie die 6-Farb-Assays mit Hilfe der FACSDiva™ Version 6.1.1 durchgeführt. Die Daten wurden zunächst als .fcs Datei gespeichert, und wurden dann mittels der Software ModFitLT V3.2 weiterausgewertet und in das .mfl Dateiformat umgewandelt. Die Daten wurden anschließend als .pdf Datei exportiert.

## 3 Material

### 3.1 Untersuchte Zelllinien

Für die Experimente dieser Arbeit wurden die drei unterschiedlichen Mammakarzinomzelllinien BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 verwendet. Alle Zelllinien haben einen epithelialen Charakter und entstammen einem invasiv duktalem Brustdrüsenkarzinom.

Die Tumorzelllinie **BT-474** (ATCC®HTB-20™) wurde von E. Lasfargues und W.G. Coutinho aus einem Mammakarzinom einer 60-jährigen Patientin etabliert.<sup>54,55</sup> Die Zellen exprimieren durch eine Genamplifikation von ErbB-2 vermehrt Her2 und sind Hormonrezeptor positiv.<sup>56</sup>

Die Zelllinie **SK-BR-3** (ATCC®HTB-30™) wurde von G. Trempe und L. J. Old aus dem Pleuraerguss eines Mammakarzinoms einer 43-jährigen Patientin entnommen.<sup>57,58</sup> Die Zellen sind Hormonrezeptor negativ und überexprimieren Her2 durch eine ErbB-2 Genamplifikation.<sup>56</sup>

**JIMT-1** ist eine aus dem Pleuraerguss eines Mammakarzinoms einer 62-jährigen Patientin etablierte Zelllinie, welche klinisch eine intrinsische Resistenz gegenüber der Trastuzumab-Therapie aufwies. Die Zellen weisen durch eine ErbB-2 Genamplifikation vermehrt Her2 auf und exprimieren keine Hormonrezeptoren.<sup>59</sup>

**Tabelle 4** Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaften. ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, ErbB2 Amp. = ErbB2 Genamplifikation;

Zelllinie	ER	PR	ErbB2 Amp.
<b>BT-474</b>	+	+	+
<b>SK-BR-3</b>	-	-	+
<b>JIMT-1</b>	-	-	+

### 3.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Beschreibung	Bezugsquelle
<b>B27 50x (1:50)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
<b>bFGF 25 µg/ml (1:2500, Endkonzentration 10 ng/ml)</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Roth Carl GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</b>	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</b>	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

<b>(PBS)</b>	
<b>Epirubicinhydrochloridlösung Epi Teva® (2mg/ml)</b>	TEVA GmbH, Ulm, Deutschland
<b>Fetales Kälberserum</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., München, Deutschland
<b>Heparin 4 mg/ml (1:1000, Endkonzentration 4 µg/ml)</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., München, Deutschland
<b>Mammary Epithelium Basal Medium (MEBM®)</b>	Lonza, Walkersville, MD USA
<b>Paclitaxel Kabi (6 mg/ml)</b>	Fresenius-Kabi, Santiago, Chile
<b>Recombinant human EGF 30 µg/ml in H<sub>2</sub>O (1:3000, Enkonzentration 10 ng/ml)</b>	Immunotools, Friesoythe, Germany
<b>Rekombinantes Human TGF-β1</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
<b>RPMI Medium 1640 (1x)</b>	gibco® von life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
<b>Trypsin 10x, eingesetzt 1:10 in PBS</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., München, Deutschland
<b>Stammzellmedium - Zusammensetzung</b>	MEBM 4 µg/ml Heparin 10 ng/ml bFGF 10 ng/ml EGF 1:50 B27 50x

### 3.3 Puffer und Lösungen

<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>10x TBS-Puffer</b>	200 mM Glycin 1% SDS 0,36 % HCl
<b>1x Semi-Dry Transferpuffer</b>	0,3 % Tris base 1,13 % Glycin 10% Methanol
<b>1x TBS-T-Puffer</b>	10 % TBS-Puffer 10x (pH 7,4) 0,1 % Tween 20
<b>2x Laemmli-Probenpuffer</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>4x Laemmli-Probenpuffer</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>5x Laemmli-Probenpuffer</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>5x Elektrophoresepuffer</b>	125 mM Tris 1,28 M Glycin 0,5 % SDS
<b>Antikörper-Verdünnungslösung</b>	1x TBST mit 3 % BSA
<b>Blockpuffer</b>	5 % Magermilch in 1x TBS-T
<b>FACS-Puffer</b>	1 % FKS 0,01 % Natriumazid ad PBS
<b>Lysepuffer</b>	1x Lysepuffer Zusätze direkt vor Gebrauch: 1x Protease



<b>Sammelgel</b>	Inhibitor Cocktail, 1mM PMSF 4 % Acrylamid 25 % Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8) 0,1 % SDS 0,01 % APS 0,0025 % TEMED
<b>Trenngel 7,5 beziehungsweise 10 %</b>	7,5 beziehungsweise 10 % Acrylamid 25 % Tris-HCl (1,5 M pH 8,8) 0,1 % SDS 0,01 % APS 0,0025 % TEMED

### 3.4 Antikörper

Antigen	Isotyp und Klon	Verdünnung oder Endkonzentration	Fluorochrom	Bezugsquelle
<b>Vimentin</b>	Kaninchen IgG (D21H3)	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>N-Cadherin</b>	Kaninchen IgG (D4R1H)	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>β-Catenin</b>	Kaninchen IgG (D10A8)	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>ZO-1</b>	Kaninchen IgG (D7D12)	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>Snail</b>	Kaninchen IgG (C15D3)	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>Slug</b>	Kaninchen IgG (C19G7)	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>TCF8/ZEB1</b>	Kaninchen IgG (D80D3)	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>E-Cadherin</b>	Kaninchen IgG (24E10)	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>Anti-rabbit IgG, HRP-linked</b>	Ziege	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>β-Aktin</b>	Maus IgG (AC15)	1:15000	-	Sigma-Aldrich Co. LLC., München, Deutschland
<b>β-Tubulin</b>	Maus IgG (TUB 2.1)	1:2000	-	Sigma-Aldrich Co. LLC., München,

<b>Anti-mouse IgG, HRP-linked</b>	Ziege	1:2000	-	Deutschland Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>TGFβ1-RI</b>	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>TGFβ1-RII</b>	Ziege IgG	0,1 µg/ml	-	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
<b>Her2</b>	IgG1, κ (Neu 24.7)	0,6 µg/ml	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
<b>CD24</b>	IgG2a, κ (ML5)	5 µg/ml	BV510	BioLegend®, San Diego, USA
<b>CD44</b>	IgG2b, κ (IM7)	2,5 µg/ml	PE/Cy7	BioLegend®, San Diego, USA
<b>EpCAM</b>	IgG2b, κ (9C4)	2,5 µg/ml	BV421	BioLegend®, San Diego, USA
<b>CD47</b>	IgG1, κ (B6H12)	10 µg/ml	PE	BD Biosciences, Heidelberg
<b>MET</b>	IgG1, κ (95106)	1 µg/ml	APC	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
<b>Isotyp Her2</b>	Mouse IgG1κ (P3.6.2.8.1)	0,6 µg/ml	FITC	eBioscience Inc., San Diego, USA
<b>Isotyp CD24</b>	Mouse IgG2a, κ (MOPC-173)	5 µg/ml	BV510	BioLegend®, San Diego, USA
<b>Isotyp CD44</b>	Mouse IgG2b, κ (eBMG2b)	2,5 µg/ml	PE/Cy7	eBioscience Inc., San Diego, USA
<b>Isotyp EpCAM</b>	Mouse IgG2b, κ (MPC-11)	2,5 µg/ml	BV421	BioLegend®, San Diego, USA
<b>Isotyp CD47</b>	IgG1, κ (P3.6.2.8.1)	10 µg/ml	PE	eBioscience Inc., San Diego, USA
<b>Isotyp MET</b>	IgG1, κ (MOPC-21)	1 µg/ml	APC	BioLegend®, San Diego, USA

### 3.5 DNA-Farbstoffe, Enzyme

Beschreibung	Bezugsquelle
<b>DAPI</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., München, Deutschland
<b>RNase</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., München, Deutschland

### 3.6 Gebrauchsfertige Reagenzien (KITS)

Beschreibung	Bezugsquelle
<b>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

<b>ECL-plus Western Blotting Detection System</b>	Amersham Biosciences, England
<b>Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Antibody Sampler Kit</b>	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

### 3.7 Reagenzien und Chemikalien

<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Merck, Darmstadt
<b>Acrylamid-Stammlösung (40%)</b>	Roth Carl GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>APS</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., München, Deutschland
<b>Bromphenolblau</b>	Merck, Darmstadt
<b>BSA</b>	Biotest AG, Dreieich
<b>Ethanol</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., München, Deutschland
<b>Glycerin</b>	Merck, Darmstadt
<b>Glycin</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>HCl</b>	Merck, Darmstadt
<b>10x Lysepuffer</b>	Cell Signaling Technology Inc., USA
<b>Methanol</b>	Merck, Darmstadt
<b>NaN<sub>3</sub> (Natriumazid)</b>	Merck, Darmstadt
<b>PMSF</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Page Ruler Prestained protein ladder</b>	Fermentas, St. Leon-Rot
<b>Precision Protein Standard</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>1x Protease Inhibitor Cocktail</b>	Roche Diagnostic, Mannheim
<b>SDS</b>	Merck, Darmstadt
<b>TEMED</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., München, Deutschland
<b>Tris base</b>	Merck, Darmstadt
<b>Tween 20</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., München, Deutschland
<b>Magermilch</b>	Roth Carl GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### 3.8 Verbrauchsmaterial

<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>15 &amp; 50 ml Cellstar Centrifuge Tubes</b>	Greiner Bio One GmbH, Solingen-Wald
<b>Combitips advanced® 10 ml</b>	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
<b>FACSClean</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>FACSFlow Trägerflüssigkeit</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>FACSRinse</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>FACSShutdown Solution</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>FACSWash</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Falcon® Multiwell™ 12-well</b>	Becton Dickinson labware, Europe
<b>Falcon® Multiwell™ 6-well</b>	Becton Dickinson labware, Europe
<b>Falcon® 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube</b>	Corning Inc., New York, USA

<b>Falcon® Zellkulturflasche T175 (600ml) mit Gasaustauschkappe</b>	Corning Inc., New York, USA
<b>Falcon® Zellkulturflasche T25 (50ml) mit Gasaustauschkappe</b>	Corning Inc., New York, USA
<b>Falcon® Zellkulturflasche T75 (250ml) mit Gasaustauschkappe</b>	Corning Inc., New York, USA
<b>Glaspipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)</b>	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
<b>Kryoröhrchen</b>	Greiner Bio One GmbH, Solingen-Wald
<b>Mikrotiterplatten</b>	Corning Inc., New York, USA
<b>Nunclon-Sphera-Platten 96F-well</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<b>Pasteurpipetten</b>	VWR international GmbH, Darmstadt
<b>Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5 ml)</b>	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
<b>PVDF-Membran</b>	Roche Diagnostics, Mannheim
<b>Reaktionsgefäße 1,5 ml &amp; 2 ml</b>	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
<b>Scepter™ Sensors 60 µl</b>	Millipore Co, Billerica MA, USA
<b>Whatman® Filterpapier</b>	Laborcenter, Nürnberg
<b>Zellschaber</b>	Greiner Bio One GmbH, Solingen-Wald

### 3.9 Geräte

<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>10-well-Kämme (1,0 mm): Mini-PROTEAN®</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Blot-Apparatur: PerfectBlue™ „Semi-Dry“-Blotter, Sedec™</b>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
<b>Brutschrank Heracell 240i CO2 Incubator</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<b>Durchflusszytometer: FACSCanto II</b>	BD BioSciences, Heidelberg
<b>Einfriergerät: Qualifreeze</b>	LabWare Ltd., Cheshire, England
<b>Elektrophoresekammer: Mini-Protean Tetra Cell</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>ELISA-Reader: EMax precision microtiter reader</b>	Molecular Devices GmbH, Ismaning
<b>Eppendorf-Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5 ml)</b>	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
<b>Gieß-Apparatur</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Glas-Platten (1mm &amp; short plates)</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>ImageQuant LAS 4000 Mini</b>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
<b>Kühlschrank</b>	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
<b>Lichtmikroskop Axiovert 200</b>	Carl Zeiss Werk, Göttingen
<b>Lichtmikroskop Labovert FS</b>	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Deutschland
<b>Magnetrührer RCT basic</b>	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
<b>Membran-Vakuum-Pumpe</b>	Vacuumbrand GmbH + Co, Wertheim
<b>Microcomputer Electrophoresis Power Supply</b>	Consort nv, Turnhout, Belgien
<b>Multipette® stream</b>	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
<b>Neubauer-Zählkammer 0,100 nm</b>	Brand GmbH + Co KG, Wertheim

<b>Pipetus: accu-jet® pro</b>	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
<b>Scepter™ Handheld Automated Cell Counter</b>	Millipore Co, Billerica MA, USA
<b>Schüttler: Polymax 1040</b>	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
<b>Sterilbank: LaminAir</b>	Heraeus Holding GmbH, Hanau
<b>Vortex REAX 2000</b>	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
<b>Vortex VF2</b>	IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
<b>VTX-3000L</b>	LMS Co., Ltd., Tokyo, Japan
<b>Wasserbad: GFL 1083 Burgwedel</b>	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
<b>Zentrifuge: 5810 R (1200 rpm)</b>	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
<b>Zentrifuge: Heraeus Fresco 17 (13300 rpm)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<b>Thermomixer 5436</b>	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
<b>Zellzähler</b>	BaumerIVO, Villingen-Schwenningen

### 3.10 Software

<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>FACSDiva 7.0</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>ModFit LT 3.2</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Axio Vision</b>	Carl Zeiss Werk, Göttingen

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Standardkultur

Die Brustkrebszellen wurden als adhärent wachsende Monolayer in Gewebekulturflaschen verschiedener Größe (T25, T75, T175) und in Gewebekulturplatten (6-well, 12-well) kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 0,5% CO<sub>2</sub>-Gehalt, 20% O<sub>2</sub>-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Als Nährmedien dienten DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) und RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), welche jeweils mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) versetzt wurden. BT-474 und SK-BR-3 wurden mit DMEM und JIMT-1 mit RPMI behandelt. Der Medienwechsel erfolgte alle 2 Tage.

##### 4.1.1.1 Zellernte und Zellzahlbestimmung

Alle zellbiologischen Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank vollzogen, um eine Kontamination der Zellkulturen zu vermeiden. Für die Zellernte wurde zunächst das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen, bevor sie mittels 0,25% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS vom Boden der Kulturflasche gelöst wurden. Zur Trypsinierung wurden die Flaschen für 5 Minuten zurück in den Brutschrank gestellt. Die enzymatische Reaktion wurde mit FKS-haltigem Medium gestoppt und die Zellsuspension in 50ml-Röhrchen überführt. Diese wurden mit 1200 rpm für 3 Minuten zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet erneut in Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit dem *Scpeter Cell Counter* der Firma Millipore bestimmt.

##### 4.1.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde wie bei der Standard-Zellernte ein Zellpellet hergestellt. Dieses wurde anschließend in kaltem Einfriermedium (DMEM oder RPMI mit 10% Dimethylsulfoxid und 20% FKS) resuspendiert und mit der Endkonzentration 10<sup>6</sup> Zellen/ 1ml Medium in Kryoröhrchen überführt. Mit dem Einfriergerät *Qualifreeze* konnten die Zellen langsam auf -80°C abgekühlt und dann in Flüssigstickstoff eingelagert werden. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt, mit Medium in 15ml-Röhrchen überführt und mit 1200 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das

Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und zunächst in T25-Flaschen kultiviert. Die Zellkultur wurde wie oben beschrieben weitergeführt.

## 4.1.2 Behandlung der Zellen

### 4.1.2.1 Zytostatika Behandlung

Zur Untersuchung der Auswirkung einer zytotoxischen Zellbehandlung wurden die ausgesäten Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Paclitaxel und Epirubicin über unterschiedlich lange Zeiträume behandelt.

#### 4.1.2.1.1 Langzeitbehandlung

Die BT-474-, SK-BR-3- und JIMT-1-Zellen wurden über 5 Monate lang je nach Toleranzgrenze der jeweiligen Zelllinie mit Paclitaxel in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,625 ng/ml und 2,75 ng/ml beziehungsweise mit Epirubicin in einem Konzentrationsbereich von 2 ng/ml und 8 ng/ml behandelt.

Zelllinie	Paclitaxel-Höchstkonzentration	Epirubicin-Höchstkonzentration
<b>BT-474</b>	2,75 ng/ml	4 ng/ml
<b>SK-BR-3</b>	2,75 ng/ml	2 ng/ml
<b>JIMT-1</b>	1,25 ng/ml	8 ng/ml

Dafür wurden aus den jeweiligen Medikamenten-Stammlösungen zunächst Vorverdünnungen mit PBS hergestellt:

Chemotherapeutikum	Konzentration der Stammlösung	Konzentration der Vorverdünnung mit PBS
<b>Paclitaxel</b>	6 mg/ml	0,5 µg/ml
<b>Epirubicin</b>	2 mg/ml	0,2 µg/ml

Das aus der hergestellten Vorverdünnung benötigte Volumen für die jeweils gewünschte Endkonzentration wurde berechnet und dem Medium in der Kulturflasche zugegeben. Dabei wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert. Mit jedem Medienwechsel erfolgte auch eine frische Zugabe an Zytostatikum. Beim Zellernte-Vorgang wurde erst nach Aussaat der Zellsuspension Paclitaxel oder Epirubicin hinzugegeben, das Einfrieren der Zellen erfolgte ohne Zytostatika Zugabe.

Zu Beginn des Behandlungszeitraums wurden die Zellen mit der niedrigsten Konzentration, also 0,625 ng/ml Paclitaxel und 2 ng/ml Epirubicin, behandelt. Nach Gewöhnung der Zellen an diese Konzentration, das heißt bei ausreichend hoher Proliferationsrate, wurde ein Teil der

Zellen der nächst-höheren Konzentration, 1,0 ng/ml Paclitaxel beziehungsweise 4 ng/ml Epirubicin, ausgesetzt, bis dieser wiederum an die neue Konzentration gewöhnt war. Nach selbem Schema wurde langsam die Paclitaxel-Konzentration in 0,25ng/ml-Schritten und die Epirubicin-Konzentration in 2ng/ml-Schritten erhöht, bis je nach Toleranzgrenze die jeweilige Höchstkonzentration erreicht wurde.

#### **4.1.2.1.2 Kurzzeitbehandlung**

Die Zellen der Zelllinien BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 wurden für 48 Stunden mit 0,5 beziehungsweise 1  $\mu$ M Paclitaxel einer intensiven Behandlung unterzogen. Dabei entsprechen 1  $\mu$ M der 342-fachen Konzentration von 2,5 ng/ml Paclitaxel.

Um nach der starken Behandlung noch ausreichend überlebende Zellen weiterkultivieren zu können, wurden je  $2 \cdot 10^6$  Zellen in einer T175-Kulturflasche ausgesät. Erst als die adhärennten Zellen in der Flasche eine 90-100%-Konfluenz erreicht hatten, wurde Paclitaxel in der gewünschten Endkonzentration dem Nährmedium der Zellen hinzugefügt, wobei die Paclitaxel-Stammlösung mit der Konzentration 6 mg/ml mit PBS zunächst auf die Konzentration 0,1 mg/ml vorverdünnt wurde.

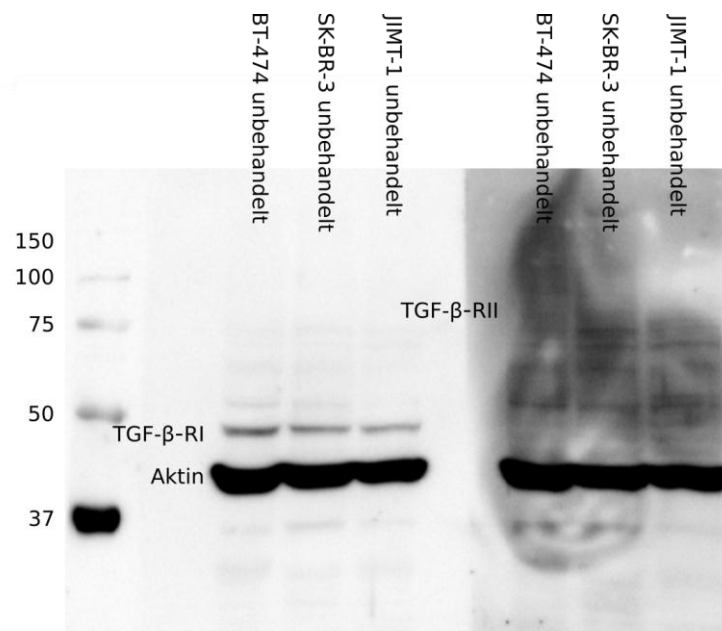
Nach der 2-tägigen Therapie wurden die toten Zellen im Überstand zusammen mit dem Medium abgesaugt und die noch adhärennten Zellen am Flaschenboden mit PBS gewaschen und deren Konfluenz beurteilt. Falls diese ausreichend war, erfolgte die Zugabe des Nährmediums. Wenn der Zellrasen zum weiteren Überleben und Proliferieren der Zellen als zu wenig dicht für ausreichend Zell-Zell-Kontakte deklariert wurde, erfolgte eine Zellernte und Neu-Aussaat der Zellen wie in der Standardkultur oben beschrieben. Dabei wurde die geerntete Zellzahl allerdings mit einer Neubauer-Zählkammer, die circa 10  $\mu$ l Zellsuspension fasst, bestimmt, da die Messung mit dem *Scepter Cell Counter* auf Grund der äußerlich sehr strapazierten und vergrößerten Zellen zu viele falsch-negative Ereignisse verzeichnete. Je nach gemessener Zellzahl wurden die Zellen in einer möglichst kleinen Kulturflasche beziehungsweise *well*-Platte dicht ausgesät, wobei beachtet wurde, dass ein Teil der Zellen als Folge der 48-Stunden-Behandlung weiter absterben würde. Die Zellen wurden wie in der Standardkultur beschrieben weiterkultiviert.

#### **4.1.2.2 Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)**

Als Kontrolle zur Langzeit- und Kurzzeitbehandlung mit Paclitaxel und Epirubicin wurden Wildtypen der Zelllinien BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 mit TGF- $\beta$ 1 behandelt.



TGF- $\beta$ 1-Dimere aktivieren den TGF- $\beta$ 1 Signalweg über die TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ I, II und III (TGF- $\beta$ -RI, II, III).<sup>15</sup> Auf den Zellen konnte mittels Westernblot eine Expression des TGF- $\beta$ -RI nachgewiesen werden, während der Nachweis des TGF- $\beta$ -RII nicht eindeutig gelang.



**Abbildung 11** Westernblot zum Nachweis der Proteine TGF- $\beta$ -RI und TGF- $\beta$ -RII auf den Zelllinien BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1. TGF- $\beta$ -RI hat ein molekulares Gewicht von 52 kDa<sup>60</sup>, TGF- $\beta$ -RII zwischen 70 und 80 kDa<sup>61</sup>. Aktin, das Referenzprotein, hat ein molekulares Gewicht von 42 kDa. Links ist der der Standard (kDa) aufgetragen.

Das verwendete rekombinante humane TGF- $\beta$ 1 ist ein extrem hydrophobes Protein, das stark an Oberflächen haftet. Aus diesem Grund wurde der Wachstumsfaktor zunächst in einer Konzentration von 20  $\mu$ g/ml in sterilem 4 mM HCl mit 1 mg/ml bovinem Serumalbumin aliquotiert.

Die Zellen wurden 7 Tage lang mit TGF- $\beta$ 1 in einer Konzentration von 5 ng/ml behandelt. Dabei wurden am Tag 0 junge Wildtypen der Zelllinien BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 in je zwei T75-Kulturflaschen ausgesät, wobei eine der Flaschen als unbehandelte Kontrolle dienen sollte. Es wurde dabei berücksichtigt, dass BT-474 und JIMT-1 unter TGF- $\beta$ 1-Behandlung langsamer wachsen als die Kontrolle. Dementsprechend wurde in diesen Flaschen im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Zellzahl ausgesät:

Zelllinie	Gesäte Zellzahl unbehandelte Kontrolle	Gesäte Zellzahl zur Behandlung mit 5ng/ml TGF- $\beta$ 1
BT-474	$4,5 \cdot 10^5$	$9,0 \cdot 10^5$
SK-BR-3	$4,5 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^5$
JIMT-1	$4,0 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^5$

Zur Zugabe von TGF- $\beta$ 1 am Tag 1 wurde in zwei 50ml-Röhrchen das jeweils benötigte Volumen DMEM (+ 10% FKS) und RPMI (+ 10% FKS) mit der zum Erreichen der Endkonzentration 5 ng/ml erforderlichen Menge aliquotiertem TGF- $\beta$ 1 versetzt. Anschließend erfolgte in allen Kulturflaschen ein Medienwechsel, wobei die unbehandelten Kontrollen mit reinem FKS-haltigem Medium, die zu behandelnden Flaschen mit den vorbereiteten TGF- $\beta$ 1-haltigen Medien versetzt wurden. In Anlehnung an die Standardzellkultur wurden an Tag 3 und 6 die Arbeitsschritte von Tag 1 wiederholt. Nach Ablauf der sieben Behandlungstage erfolgte die Zellernte an Tag 8, wobei die Zellen entweder für die durchflusszytometrische Messung vorbereitet oder zur Durchführung eines Westernblot-Versuchs lysiert wurden.

Gleich der 7-Tage Behandlung wurden die Zellen in einem zweiten Versuch für insgesamt 6 Wochen behandelt. Dabei erfolgten Zellkultur, Behandlung und Ernte genau wie im 7-Tage Versuch.

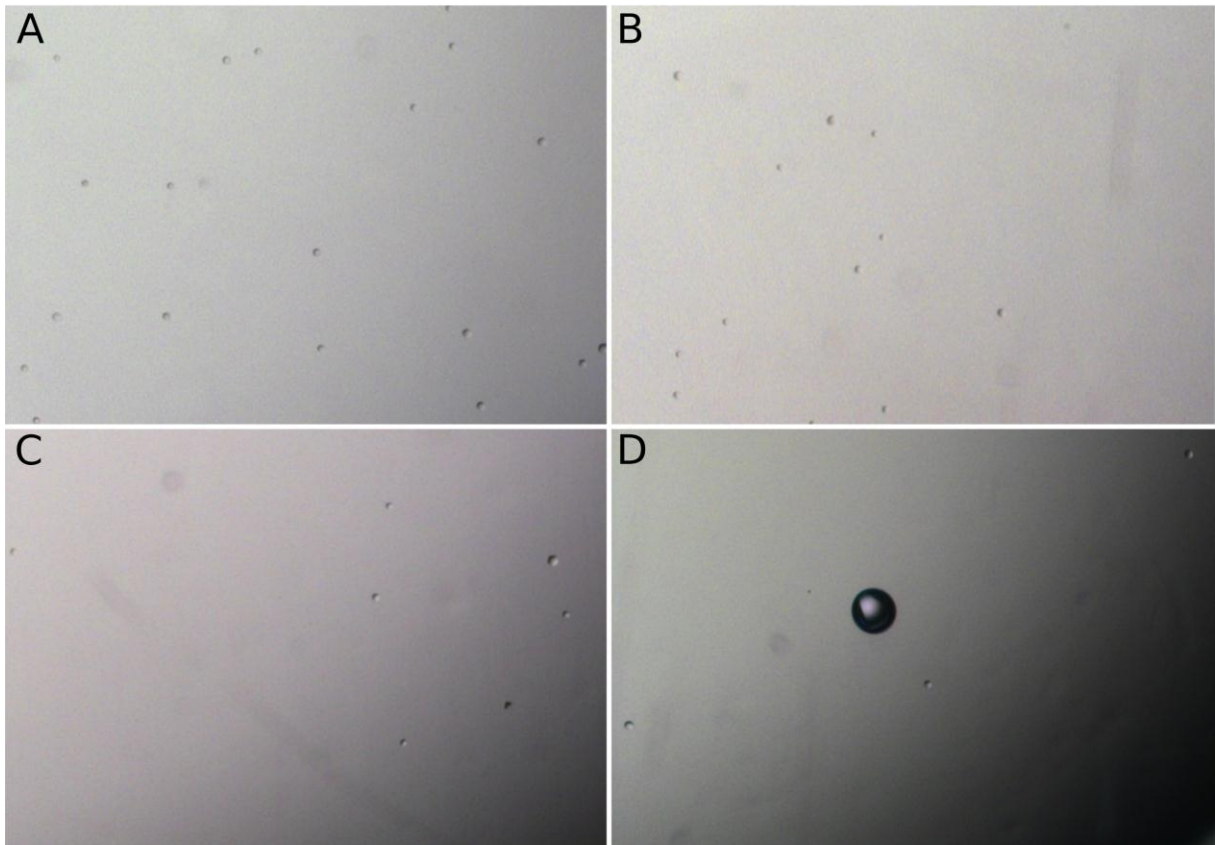
## 4.2 *Mammosphere*-Assay - Dreidimensionale Zellkultur

In einer dreidimensionalen Zellkultur können Zellen non-adhärenent wachsen. Ein *sphere*-Assay ist ein *readout*-Test für zelluläre Klonogenität in vitro. Das Assay basiert auf der Theorie, dass ein *sphere* durch Klonalität aus einer Zelle hervorgeht - dies gelingt durch die Fähigkeit der Zelle, sich selbst zu erneuern, was eine Stammzeleigenschaft darstellt. Wiederum bedeutet dies, dass die Klonalität eines *spheres* nur dann garantiert ist, wenn zuvor nur eine Zelle ausgesät wurde. *Spheres*, die aus mehreren gesäten Zellen entstehen, können neben klonalem Wachstum möglicherweise auch aus Aggregaten mehrerer Zellen entstehen.<sup>62</sup> Da es sehr schwierig ist, nur eine Zelle auszusäen, wurden in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen sogenannte *Dilution*-Assays angefertigt. Hierbei wurden mehrere Versuchsansätze in abnehmender Zellzahl durchgeführt: es wurden je 500, 100, 50 und 10 Zellen in den *wells* ausgesät. So sollte geprüft werden, wie sich die *sphere*-Bildung zur abnehmenden Zellzahl verhält und ob auch bei nur wenig ausgesäten Zellen, *spheres* entstehen. Dabei wurden von den jeweils untersuchten Zelltypen je eine unbehandelte Kontrolle mit einer zytostatisch behandelten Zellpopulation verglichen.

Vor Durchführung der *mammosphere*-Assays wurde das Stammzellmedium aus MEBM (*Mammary Epithelial Basal Medium*), einem speziellem Kulturmedium, das für das Wachstum von humanen Brustepithelzellen optimiert wurde, und verschiedenen Wachstumsfaktoren (B27, EGF, Heparin, bFGF) frisch hergestellt (s. 3.2). Sechs Tage vor

Ansetzung der *mammospheres* wurden die zu untersuchenden Zellen in T25-Flaschen zu 0,25 Mio in 5 ml des entsprechenden Mediums mit 10% FKS und gegebenenfalls mit Zytostatikum-Zusatz ausgesät. Dabei wurden von den langfristig zytotoxisch behandelten Zellen je zwei Kulturflaschen angesetzt. Nach 4 Tagen erfolgte ein Medienwechsel, wobei das FKS-haltige Medium durch das Stammzellmedium ausgetauscht wurde. Die Zellen sollten so die Möglichkeit bekommen, sich an das neue Medium zu gewöhnen, bevor sie als 3D-Kultur im selben Medium angesetzt wurden. Dafür wurde das FKS-haltige Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen wurden mit 5 ml PBS vorsichtig gewaschen. Nach Absaugen des Wasch-PBS wurden 5 ml Stammzellmedium zugegeben, wobei bei den langfristig mit Zytostatika behandelten Zellen nur eine der beiden Kulturflaschen weiterhin einen Zytostatikum-Zusatz bekam. So sollte überprüft werden, ob die weitere Inkubation mit dem Zytostatikum im Vergleich zum Absetzen der Behandlung zwei Tage vor *mammosphere*-Aussaat einen Effekt hat. Am Tag der Aussaat wurden die Zellen wie in der Standardzellkultur beschrieben geerntet, dabei wurde das Trypsin mit 5 ml Stammzellmedium gestoppt und das Pellet in 5 ml desselben Mediums resuspendiert. Die Zellen wurden dann mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dabei war darauf zu achten, dass die Zellen einzeln vorlagen. War dies nicht der Fall, musste die Zellsuspension nochmal mehrfach vorsichtig, um Zellschäden zu vermeiden, auf- und ab-pipettiert werden, bis nach nochmaliger Kontrolle mittels der Neubauer-Kammer keine Zelldubletten und -aggregate mehr feststellbar waren. Dies ist essenziell, um die Klonalität der entstehenden *spheres* zu gewährleisten. Anschließend wurden verschieden konzentrierte Zellsuspensionen mit den Endkonzentrationen 500, 100, 50 und 10 Zellen pro 200 µl im Rahmen von *Dilution*-Assays in 50ml-Röhrchen hergestellt. Die *mammospheres* wurden auf einer speziell-beschichteten sterilen Zellkulturplatte, die ein adhärentes Zellwachstum verhindert und ein Wachstum der Zellen in Suspension ermöglicht, ausgesät. Dafür wurden die 96-well-Nunclon-Sphera-Platten der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. mit flachem Boden benutzt, was die Ansammlung und Aggregation der *spheres* in der Mitte der Platte verhindern sollte. Um vergleichende Messungen vornehmen zu können, wurden pro zu untersuchender Zellpopulation 500, 100, 50 und 10 Zellen mit einem Endvolumen von 200 µl in je acht *wells* ausgesät.

## BT-474 bei Aussaat



**Abbildung 12** BT-474 Zellen einzeln ausgesät, je ein *well* beispielhaft fotografiert. A= Aussaat 500 Zellen B= Aussaat 100 Zellen C = Aussaat 50 Zellen D = Aussaat 10 Zellen.

In Anlehnung an die Standardzellkultur wurden die *mammosphere*-Platten im Brutschrank bei 37°C, 0,5% CO<sub>2</sub>-Gehalt, 20% O<sub>2</sub>-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Um eine Aggregation der Zellen und *spheres* zu verhindern, war auf einen sorgfältigen Umgang der Platten zu achten: der Transport der Platte sollte möglichst waagrecht und nicht ruckartig erfolgen, außerdem musste die Tür des Brutschranks vorsichtig geschlossen werden, um Erschütterungen zu vermeiden. Da durch das nicht-adhärente Wachstum der Zellen kein Medienwechsel durchgeführt werden konnte, erfolgte an Tag 8 nach Aussaat pro *well* eine vorsichtige Zugabe von 70 µl Stammzellmedium.

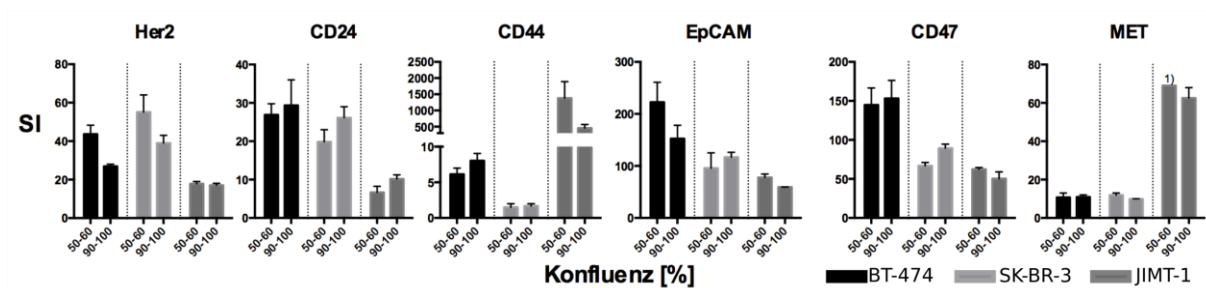
An Tag 4 und Tag 12 nach Aussaat der Zellen wurde die *sphere*-Platte unter dem mit einem Computer gekoppelten Mikroskop Axiovert 200 der Firma Zeiss ausgewertet. Im Programm Axio Vision 4.8 konnten die *spheres* fotografiert und gezählt werden. Anschließend konnte der Durchmesser der ermittelten *spheres* gemessen werden.

## 4.3 Durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik

### 4.3.1 Oberflächenmarkermessung mittels 6-Farb-Assays

Zur Herstellung der Proben für die 6-Farb-Assays wurden die Zellen zunächst wie in der Standardzellkultur geerntet und in ein 50ml-Röhrchen gegeben. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 Minuten wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 10%FKS-haltigem Medium der jeweiligen Zellkultur resuspendiert (2 ml für Zellen aus T25-Flaschen, 5ml bei T75- und 10 ml bei T175-Flaschen). Folgende Arbeitsschritte wurden unsteril durchgeführt. Die Zellzahl wurde mittels dem *Scepter Cell Counter* bestimmt. Pro zu messender Zellpopulation wurden je ein FACS-Tube für die Positiv-(Stain-) und Negativ-(Isotyp-)Kontrolle benötigt. Dafür wurden je 250.000 - 500.000 Zellen (berechnetes Volumen an Zellsuspension) in jedes Tube gegeben. Nach Zentrifugation der Zellen bei 1200 rpm für 3 Minuten wurde das Pellet als Waschvorgang mit 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und erneut bei selben Bedingungen zentrifugiert. Die Zellen konnten dann mit dem Mastermix für die Stain- beziehungsweise Isotypkontrolle gefärbt werden. Zur Herstellung des jeweiligen Mastermix wurden die verwendeten Fluoreszenz-markierten Antikörper in den berechneten Endkonzentrationen (s. 3.4) in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit FACS-Puffer verdünnt. Zur Färbung wurden die Zellen nach dem Waschvorgang in je 50 µl Mastermix resuspendiert und für 30 min bei 4°C ohne Lichtexposition inkubiert. Die Zellen wurden nochmals mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und konnten dann durchflusszytometrisch nach Standardprotokoll analysiert werden.

Es war darauf zu achten, dass zu messende Zellen immer eine ähnliche Konfluenz in Zellkulturflaschen aufwiesen, da bei geringer beziehungsweise sehr hoher Zelldichte in der Zellkulturflasche Zellen Oberflächenmarker unterschiedlich stark exprimierten. Dies war vor allem bei Her2 der Fall: bei den Zelllinien BT-474 und SK-BR-3 kam es bei sehr hoher Zelldichte zur Abnahme von Her2 auf der Oberfläche. Dies lässt sich durch die Eigenschaft von Her2 als Wachstumsfaktorrezeptor erklären: bei zu vielen Zell-Zell-Kontakten regulieren die Zellen den Rezeptor auf ihrer Oberfläche herunter. (s. Abbildung 13)



**Abbildung 13** Einfluss der Konfluenz auf Expression von Her2, CD24, CD44, EpCAM, CD47 und c-MET auf den Oberflächen der Zellen BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1. Abkürzungen: SI = Stain-Index, 1) nur ein Wert. n = 2.

### 4.3.2 Proliferationsmessungen mit DAPI

Nach der Ernte wurden je 0,25 Mio Zellen als Zellsuspension in ein FACS-Tube gegeben. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in einem Waschschrift in 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 500 µl kaltem 70%-Methanol aufgelöst und für 24 Stunden bei 4°C fixiert. Die Zugabe des Methanols erfolgte bei gleichzeitigem Vortexen der Probe, um einer Verklumpung der Zellen vorzubeugen. Um der Verdunstung des Methanols entgegenzuwirken wurden die Tubes mit einem Deckel verschlossen. Die Zellen wurden dann mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand musste vorsichtig abgesaugt werden, da die in Methanol-fixierten Pellets weniger stabil sind. Anschließend wurde das Pellet in 220 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 25 µl RNase für 20 Minuten in einem 37°C-warmen Wasserbad inkubiert. Danach wurden 5 µl DAPI hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen der Tubes erfolgte eine mindestens 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur ohne Lichtexposition. Die Tubes konnten dann direkt nach Standardprotokoll durchflusszytometrisch gemessen werden.

## 4.4 Proteinbiochemische Methoden

### 4.4.1 Herstellung von Lysepuffer und denaturierten Proteinlysaten

Vor der Herstellung der Lysate wurde der Lysepuffer frisch zusammengesetzt. Für 1 ml gebrauchsfertigen Puffer wurden 100 µl Lysepuffer 10x, 142,9 µl Protease Inhibitor Cocktail 7x, 10 µl der 100 mM-Stocklösung Phenylmethansulfonylfluorid und 747,1 µl destilliertes Wasser vermischt.

Zur Lysatherstellung wurden die Zellen in den Kulturflaschen zweimal mit PBS gespült, dieses wurde anschließend gründlich abgesaugt. Zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden

wurde der frisch hergestellte Lysepuffer zugegeben (50 µl für T25, 130 µl für T75 und 300 µl für T175). Nach einer Inkubation bei 4°C für 30 min wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden heruntergekratzt. Das Zelllysate wurde dann mit einer Pasteurpipette in ein Eppendorf-Cup überführt, welches anschließend bei 4°C und 1200 rpm für 10 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt, das Pellet wurde verworfen. Für die spätere Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 3 µl gesondert aliquotiert, während der Rest des Lysats bei -80°C eingefroren wurde.

#### **4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein-Assay-Kit**

Der Durchführung des Western Blots wurde die Proteinkonzentrationsbestimmung der angefertigten Lysate mittels des BCA-Protein-Assay-Kits von Pierce vorausgesetzt. Das Kit basiert auf dem Prinzip der Biuretreaktion, wobei es im alkalischen Milieu zu Komplexbildungen von Peptidbindungen mit Kupferionen unter Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$  kommt. Die so entstandenen  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen Chelatkomplex, was zu einem stark violetten Farbumschlag führt. Die Farbintensität ist zur Proteinkonzentration direkt proportional und kann photometrisch bestimmt werden.<sup>63</sup>

Zur Durchführung der photometrischen Messung wurden die Lysate im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Auf eine Mikrotiterplatte wurden 10 µl des verdünnten Lysats, 10 µl Proteinstandard (25-2000 µg/ml BSA in PBS) und als Negativkontrolle 10 µl reines PBS aufgetragen. Anschließend wurde das Reagenz A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) mit dem Reagenz B (4% Kupfersulfat) im Verhältnis 1:50 gemischt. Von dem Gemisch wurden je 200 µl in jedes *well* pipettiert. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min wurden die Proben photometrisch mittels eines ELISA-Readers vermessen, wobei die Absorption von 546 nm zur gesamten Proteinkonzentration proportional war. Die genaue Proteinkonzentrationsbestimmung in den Proben erfolgte dann mithilfe einer Standard-Eichgeraden.

#### **4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts. Die Proteine wandern dabei durch ein quervernetztes Polyacrylamidgel. In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten durchwanderten die Proteine erst ein Trenngel (pH = 8,8) mit 7,5% beziehungsweise 10% und dann ein Sammelgel (pH = 6,8) mit 4% Acrylamid: durch Variierung der Acrylamid-Konzentration wird der Vernetzungsgrad der Gele beeinflusst. Proteine mit geringerem Molekulargewicht können sich im Gel leichter bewegen

als schwere Proteine und legen somit eine weitere Laufstrecke pro Zeiteinheit zurück als Proteine mit hohem Molekulargewicht. Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die unidirektionale Wanderung des Proteingemischs vom Minus- zum Pluspol sichergestellt. SDS lagert sich an Aminosäureseitenketten an, wodurch die Proteine denaturiert werden und durch den Dodecylsulfat-Rest eine negative Ladung erhalten, die ihre eigentliche Ladung überdeckt. Dadurch weisen SDS-beladene Proteine nahezu einheitliche Ladung-Masse-Verhältnisse auf.<sup>63,64</sup>

Vor jeder Anwendung mussten die Gele frisch gegossen werden (s. 3.3). Die radikalische Polymerisation wurde erst kurz vor dem Gießen der Gele durch Zugabe von TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin) und Ammoniumpersulfat zur Acrylamidlösung in Tris-HCl-Puffer, SDS und destilliertem Wasser gestartet. Dabei wurde erst das Trenngel und nach dessen Auspolymerisierung das Sammelgel gegossen, in welches vorsichtig ein Kamm zur Taschenbildung eingesetzt wurde, bevor auch dieses auspolymerisierte. Anschließend wurden die Gele in die Laufkammer eingespannt und mit Elektrophoresepuffer bedeckt.

Um am Ende eine Endkonzentration von 20 µg/ Linie zu erreichen, wurden die Lysate je nach Proteinkonzentration mit der entsprechenden Menge 2x, 4x beziehungsweise 5x Laemmli-Puffer gemischt, für fünf Minuten bei 95°C erwärmt, auf Eis wieder gekühlt, bei 13300 rpm kurz zentrifugiert und dann in je eine Tasche des Gels pipettiert. Dabei wurde für jedes Gel ein Molekulargewichtsstandard zur Kontrolle in eine Tasche und reiner Blaupuffer für eine gleichmäßige Verteilung in sonst leere Taschen gegeben. Für das Durchlaufen der Proteine durch das Sammelgel wurde für circa 20 min für insgesamt zwei Gele eine Spannung von 80 V angelegt. Nachdem die Laufront an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel angekommen war, wurde die Spannung für eine weitere Stunde auf 120 V erhöht.

#### **4.4.4 Westernblot**

Zum Nachweis spezieller Proteine kann man sich der hohen Spezifität von Antikörpern bedienen. Da die Proteine im SDS-Gel für Antikörper nicht zugänglich genug sind, wird erst ein Western Blot durchgeführt. Dabei werden die Proteine elektrophoretisch vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran überführt. Es wurde dafür die Methode des *Semi-Dry Blotting* angewandt, bei dem das fertige SDS-Gel und die PVDF-Membran zwischen mehrere Lagen mit Puffer durchtränkter *Whatman*-Papiere eingelegt werden. Der ganze Stapel wird dann zwischen zwei Flächenelektroden der Blot-Apparatur gelegt, an die man dann eine Spannung anlegt.<sup>64</sup>



Zur Durchführung des Westernblots wurde das SDS-Gel vorsichtig von den Glasplatten abgelöst, das Sammelgel wurde vorsichtig abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde 3 Minuten in *Semi-Dry*-Transferpuffer equilibriert. Die *Whatman*-Filterpapierstücke wurden in *Semi-Dry*-Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde erst für 15 s in Methanol, dann für 2 Minuten in destilliertem Wasser und anschließend in *Semi-Dry*-Transferpuffer eingelegt. Auf die Positivelektrode der Blot-Apparatur wurde der Blot wie folgt aufgebaut. Es wurden als erstes sechs getränkte Filterpapiere auf die Positivelektrode gelegt. Anschließend wurden in Reihe die PVDF-Membran, das SDS-Gel und weitere drei getränkte Filterpapiere daraufgestapelt. Letztlich wurde dann die Negativelektrode auf den Stapel platziert. Die Transferrichtung der Proteine erfolgte von der Negativ- zur Positivelektrode beziehungsweise vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran.

Luftblasen zwischen den Schichten wurden vor Bedeckung mit der Negativelektrode mithilfe eines leeren Falcon-Röhrchens vorsichtig ausgewalzt. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 60 mA für eine Stunde angelegt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Übertragung des Standards überprüft.

#### **4.4.5 Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz**

Nach abgelaufenem Westernblot wurde die PVDF-Membran zur Blockierung freier und unspezifischer Bindungsstellen in einer Lösung aus 5% Milchpulver in TBST-Puffer (Blockierungspuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt. Für die erste Immunreaktion wurde die Membran mit einem 3ml-Gemisch aus dem primären Antikörper und der Antikörper-Verdünnungslösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper wurden zum einen dem *Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Antibody Sampler Kit #9782* von Cell Signaling Technology entnommen und 1:1000 verdünnt eingesetzt. Zum anderen wurden zum Nachweis von TGFβ-Rezeptoren der TGFβ-Rezeptor-I-Antikörper von Cell Signaling und der TGFβ-Rezeptor-II-Antikörper von R&D jeweils in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt. Zusätzlich wurde als Referenz ein Antikörper gegen β-Aktin oder β-Tubulin in der Verdünnung 1:15000 beziehungsweise 1:2000 eingesetzt. Zur Verdünnung der primären Antikörper wurde 1xTBST-Lösung mit 3% BSA verwendet. Am nächsten Tag wurde zum Entfernen des überschüssigen und ungebundenen Antikörpers die Membran dreimal über je 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend konnte der sekundäre Antikörper anti-rabbit IgG beziehungsweise anti-mouse IgG in einer Verdünnung 1:2000 (mit TBST-Puffer) eingesetzt werden. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran wieder zur Entfernung von überschüssigem

Antikörper dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Zur Detektion der gesuchten Proteine wurde das ECL(*enhanced chemoluminescence*)-System von Amersham verwendet. Die Lumineszenz erfolgt dabei auf der Basis einer chemischen Reaktion. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert unter Katalyse von  $\text{H}_2\text{O}_2$  das zyklische Diacylhydrazin Luminol und führt so zur Freisetzung von Licht. Zur Durchführung der Reaktion wurden die Reagenzien A und B des Kits im Verhältnis 1:1 zum Endvolumen 2 ml vermischt und auf die Membran für eine Inkubationszeit von 1 Minute gegeben. Anschließend konnte man die Detektions-Lösung abtropfen lassen und die Membran mit der Proteinseite nach oben zeigend zwischen zwei sauberen durchsichtigen Folien luftblasenfrei in eine Sequenziermappe legen.

Durch die Chemolumineszenz konnte der sekundäre Antikörper sichtbar gemacht werden. Der Detektionsfilm wurde dann mit Hilfe des ImageQuant LAS 4000 mini ausgewertet, mit dessen Hilfe pro Antigen sogenannte „Spots“ dargestellt werden konnten. Der Schwärzungsgrad war dafür das Maß für die Menge an gebundenem phosphoryliertem Protein.

#### **4.4.6 Densitometrische Auswertung**

Mit dem Programm ImageQuant TL konnten im Anschluss an die Chemolumineszenz die Proteinmembranen ausgewertet werden. Zunächst wurden die Banden der Spuren des Blots genau eingegrenzt. Die Software ermittelt die Summe der Intensitäten und markiert die Werte als Spitzen im Verlauf der Spur. Anschließend wird die Fläche unter der Kurve als Integral berechnet. Die ermittelten Werte wurden ins Verhältnis zum Gesamtproteingehalt gesetzt (dargestellt durch  $\beta$ -Aktin oder  $\beta$ -Tubulin) und auf die Kontrollwerte normiert. Anschließend wurden die Protein-Spots durch Kästchen genau umschlossen, die Intensität der Schwärzung gemessen und mit der Schwärzung des Kontrollspots korrigiert. Relevante Ergebnisse wurden abschließend in Diagrammen dargestellt.

#### **4.5 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurden *SPSS Statistics* und *GraphPad Prism 6.0* verwendet. Alle Graphen wurden mittels *GraphPad Prism 6.0* erstellt.

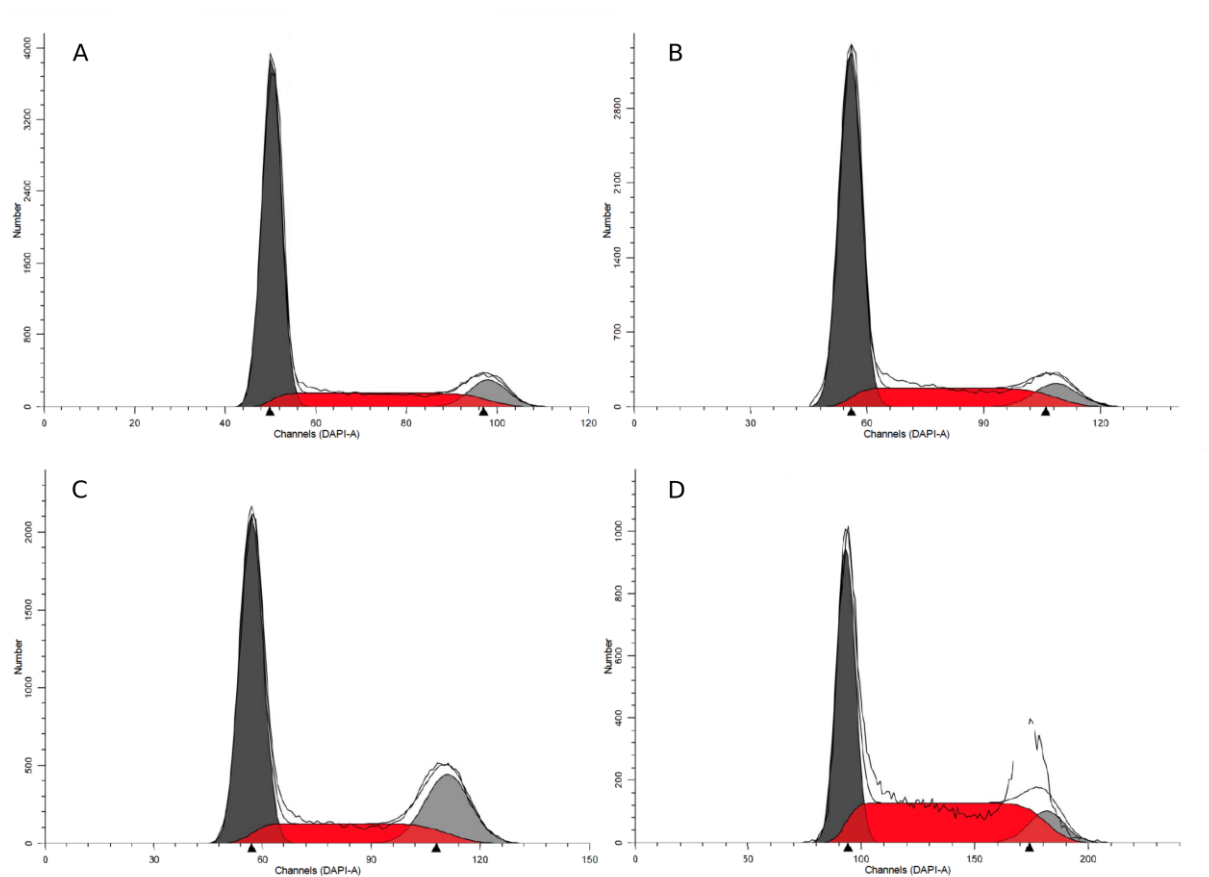
Die Verdopplungszeiten-Daten der Zellen wurden anhand von ANOVAs analysiert (*GraphPad Prism*) und die Verarbeitung der Daten der durchflusszytometrisch durchgeführten quantitativen Oberflächenmarkermessung erfolgte durch lineare

Regressionsanalyse (*SPSS*). Die *sphere*-Anzahl Daten wurden mittels ANOVAs und anschließend post-hoc gepaarten T-Tests analysiert (*SPSS*). Für die deskriptiven Daten sind der Mittelwert ( $\mu$ ) und der *standard error of the mean* (*SEM*) angegeben.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Proliferationsbestimmungen mittels durchflusszytometrisch gemessener S-Phasen und rechnerisch bestimmter Verdopplungszeiten

Es wurden für alle Behandlungen **S-Phase-Messungen** wie in 2.1.3 und 4.3.2 beschrieben durchgeführt. Dabei fiel auf, dass Zellen, die eine im Vergleich zum Wildtyp niedrigere Proliferation hatten, trotzdem einen erhöhten Prozentanteil S-Phase aufwiesen, was aber offensichtlich nicht das tatsächliche Wachstum der Zellen widerspiegelte. Dieses Paradoxon lässt sich möglicherweise durch die Wirkweise der verwendeten Zytostatika erklären: Paclitaxel führt zum S-Phase-Arrest, Epirubicin durch DNA-Strangbrüche und unvollständiger S-Phase zu Polymorphismen.<sup>65</sup> Zellen, die gegenüber der Zytostatika nicht resistent sind und dadurch langsamer als die Wildtyp-Kontrolle wachsen, weisen also vermutlich eine andere prozentuale Verteilung von G1-, S- und G2-Phase auf. In diesen Fällen kann die S-Phase nicht als repräsentativ für die Proliferationsaktivität angesehen werden.



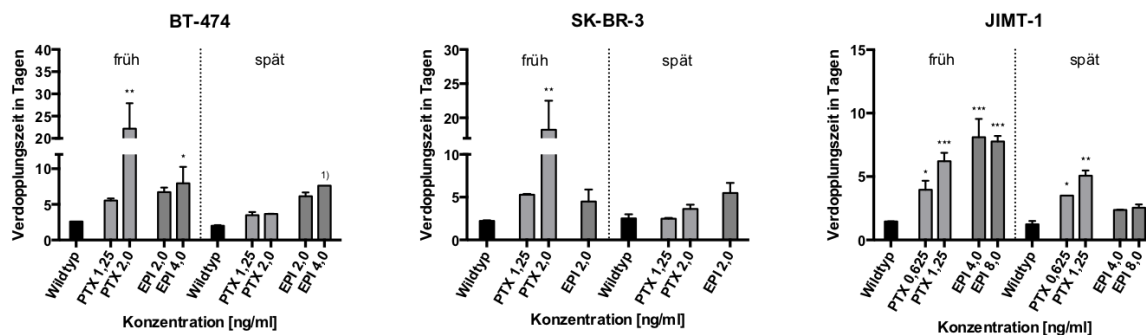
**Abbildung 14** S-Phase-Messungen von BT-474 unter verschiedenen Behandlungen und zu verschiedenen Zeitpunkten. A: BT-474-Zellen unbehandelt zum Vergleich. B: BT-474-Zellen nach 24 Wochen Paclitaxel

Behandlung (2,75 ng/ml), Verdopplungszeit ähnlich der der Kontrolle - S-Phase ähnelt der der Kontrolle. C: BT-474-Zellen nach 14 Wochen Epirubicin Behandlung (4,00 ng/ml), S-Phase ähnelt der der Kontrolle, Verdopplungszeit ebenso. D: strapazierte BT-474-Zellen nach nur 3 Wochen Epirubicin Behandlung (4,00 ng/ml), S-Phase trotz ungleicher und sehr langer Verdopplungszeit größer als die der Kontrolle.

Folglich wurde angenommen, dass der Kontrolle ähnliche S-Phasen für eine Resistenz der untersuchten Zellen gegenüber den Chemotherapeutika Paclitaxel und Epirubicin sprechen.

### 5.1.1 Analyse der Verdopplungszeiten der langfristig zytostatisch behandelten BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen

Da S-Phasen-Bestimmungen als Proliferationsmessungen bei Paclitaxel- und Epirubicin-behandelten Zellen nicht für alle untersuchten Zellen als valide angenommen werden konnten, wurden zusätzlich die Verdopplungszeiten der Zellen berechnet, das heißt die Zeit, die die Zellen benötigen, um das Doppelte der eingesetzten Zellzahl zu erreichen. Dabei wurden pro Zelllinie während des Behandlungszeitraums von über fünf Monaten frühe Messungen (im zweiten Monat) und späte Messungen (im fünften Monat) mit dem Wildtyp, der über den kompletten Zeitraum als Kontrolle mitlief, im gleichen Zeitraum verglichen. Exemplarisch wurden dabei je eine niedrige und eine hohe Behandlungskonzentration von Paclitaxel und Epirubicin untersucht.



**Abbildung 15** Verdopplungszeiten der Zelllinien BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 unter unterschiedlichen Behandlungen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Abkürzungen: früh = früher Messzeitpunkt (nach 2 Monaten Behandlung), spät = später Messzeitpunkt (nach 5 Monaten Behandlung); Wildtyp = unbehandelte Kontrolle, PTX = Paclitaxel, EPI = Epirubicin; 1) = nur ein Messwert; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; deskriptive Statistik: Werte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM, 2-way-Anova in GraphPad Prism 6 zum Vergleich behandelter Zellen zum jeweiligen Wildtyp zum frühen beziehungsweise späten Messzeitpunkt,  $n = 2$ ;

Die **Verdopplungszeiten** der mit Paclitaxel- und Epirubicin-behandelten **BT-474** Zellen im Vergleich zum Wildtyp zum frühen und späten Zeitpunkt zeigen, dass die behandelten Zellen im Vergleich zu den Unbehandelten langsamer proliferieren. Dabei sieht man zum frühen Zeitpunkt eine sehr signifikant höhere Verdopplungszeit der mit 2,0 ng/ml Paclitaxel behandelten Zellen ( $22,18 \pm 5,72$  Tage) verglichen mit dem Wildtyp ( $2,60 \pm 0,01$  Tage). Mit zunehmender Toleranz der Zellen zum späten Zeitpunkt lässt sich bei selber

Behandlung kein signifikanter Unterschied mehr zum Wildtyp erkennen. Mit 4,0 ng/ml Epirubicin behandelte Zellen verdoppeln sich zum frühen Messpunkt mit  $7,95 \pm 2,31$  Tagen signifikant langsamer als die unbehandelten Zellen mit  $2,60 \pm 0,01$  Tagen, auch hier nimmt dieser Effekt zum zweiten Zeitpunkt ab. Insgesamt lässt sich erkennen, dass sich die Verdopplungszeiten der behandelten Zellen mit der Zeit denen der unbehandelten Zellen nähern.

Während sich die **Verdopplungszeiten** der behandelten **SK-BR-3** Zellen im Vergleich zum Wildtyp zum späten Zeitpunkt nicht signifikant unterscheiden, erkennt man, dass zum frühen Zeitpunkt mit 2,0 ng/ml Paclitaxel behandelte SK-BR-3-Zellen sehr signifikant langsamer wachsen (Verdopplung in  $18,25 \pm 4,25$  Tagen) als die unbehandelte Kontrolle (Verdopplung in  $2,22 \pm 0,08$  Tagen). Dieser Effekt ist zum späten Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Mit Epirubicin behandelte SK-BR-3 Zellen zeigen auch zum frühen Messzeitpunkt kein signifikant langsames Wachstum als die unbehandelte Kontrolle.

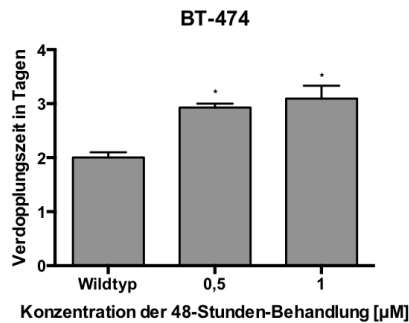
Behandelte **JIMT-1** Zellen weisen zum frühen Zeitpunkt signifikant längere **Verdopplungszeiten** auf als die Kontrolle. Dabei verdoppeln sich mit 0,625 ng/ml Paclitaxel behandelte Zellen in  $3,95 \pm 0,70$  Tagen und mit 1,25 ng/ml Paclitaxel behandelte Zellen in  $6,21 \pm 0,67$  Tagen hoch signifikant langsamer als der Wildtyp mit  $1,46 \pm 0,01$  Tagen. Mit 4,0 ng/ml und 8,0 ng/ml Epirubicin behandelte Zellen weisen mit einer Verdopplungszeit von je  $8,12 \pm 1,44$  und  $7,76 \pm 0,44$  Tagen ebenfalls hoch signifikant längere Verdopplungszeiten auf als die Kontrolle zum frühen Zeitpunkt. Während zum späteren Zeitpunkt mit Epirubicin behandelte Zellen nicht mehr signifikant langsamer wachsen, wachsen die mit 0,625 ng/ml beziehungsweise 1,25 ng/ml Paclitaxel behandelten Zellen weiterhin signifikant (Verdopplung in  $3,50 \pm 0,00$  Tagen) beziehungsweise sehr signifikant (Verdopplung in  $5,07 \pm 0,41$  Tagen) langsamer als die Wildtyp-Kontrolle (Verdopplung in  $1,23 \pm 0,27$  Tagen). Trotzdem verzeichnen die mit Paclitaxel behandelten Zellen zum späteren Zeitpunkt ein schnelleres Wachstum als zum Frühen.

Aus den Daten der Verdopplungszeiten lässt sich auch herauslesen, welche Zelllinie sich mit der Zeit besser beziehungsweise schlechter an die Behandlungen mit den beiden Zytostatika adaptieren konnte. Dabei spricht eine Abnahme der Verdopplungszeit über die Zeit für eine Toleranzzunahme und eine mögliche Resistenzentwicklung der Zellen gegenüber Paclitaxel beziehungsweise Epirubicin.

Die Verdopplungszeiten von BT-474 und SK-BR-3 unter Paclitaxelbehandlung nähern sich zum späten Messzeitpunkt den Zeiten des Wildtyps an. Bei JIMT-1 unter Paclitaxelbehandlung ist das nicht der Fall. Dies spricht dafür, dass BT-474 und SK-BR-3 toleranter gegenüber Paclitaxel geworden sind, was sich auch darin äußert, dass die Höchstkonzentration, mit der die beiden Zelllinien behandelt werden konnten bei 2,75 ng/ml Paclitaxel lag. Da JIMT-1 keine adäquate Toleranzentwicklung zeigt, konnte diese Zelllinie nur mit maximal 1,5 ng/ml Paclitaxel behandelt werden. In den Verdopplungszeiten der unter Epirubicin stehenden Zellen lassen sich zum späten Zeitpunkt für alle Zelllinien im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle keine signifikanten Unterschiede erkennen. Dennoch kann man sagen, dass JIMT-1 über die Zeit eine höhere Toleranz aufweist als die beiden anderen Zelllinien. Während JIMT1-Zellen mit einer Höchstkonzentration von 8 ng/ml behandelt wurden, konnten bei BT-474 und SK-BR-3 nur Höchstkonzentrationen von 4 beziehungsweise 2 ng/ml Epirubicin erreicht werden.

#### **5.1.2 Proliferationsanalysen der mit hochkonzentriertem Paclitaxel kurzzeitig behandelten BT-474-Zellen**

Die 48-Stunden-Kurzzeitbehandlung der verschiedenen Zelllinien mit 0,5 beziehungsweise 1,0  $\mu$ M Paclitaxel wurde wie in 4.1.2.1.2 beschrieben durchgeführt. BT-474-Zellen waren dabei die einzigen Zellen, die nach der 48-Stunden-Behandlung erfolgreich weiterkultiviert werden konnten. Die SK-BR-3- und JIMT-1-Zellen wurden zwar weiterkultiviert, verzeichneten aber stetig ein negatives Wachstum, sodass die Kulturen einige Wochen nach Behandlung verworfen werden mussten. Bei allen Zelllinien war nach der intensiven 48-Stunden-Behandlung ein starkes Absterben der Zellen zu beobachten, sodass die in ursprünglich T175-Flaschen gesäten Zellen in 6- beziehungsweise 12-*well*-Platten weiterkultiviert werden mussten. Erst nach einer „Erholungszeit“ von etwa fünf Monaten, konnte eine Wiederaufnahme der Proliferation bei den behandelten BT-474-Zellen festgestellt werden. Die Berechnung der Verdopplungszeiten erfolgt hier also nur zu einem späten Zeitpunkt (5 Monate nach Behandlung).



**Abbildung 16** Verdopplungszeiten von BT-474 Zellen nach 48 Stunden Paclitaxel Behandlung. Abkürzungen: Wildtyp = unbehandelte Kontrolle, 0,5 = 48 Stunden Behandlung mit 0,5 µM Paclitaxel, 1,0 = 48 Stunden Behandlung mit 1,0 µM Paclitaxel; \* =  $p < 0,05$ ; deskriptive Statistik: Werte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM, 1-way-Anova in GraphPad Prism 6 zum Vergleich behandelter Zellen zum Wildtyp zum späten Messzeitpunkt (nach 5 Monaten),  $n = 2$ ;

Nach monatelanger Erholungszeit nach Kurzzeitbehandlung weisen die mit 0,5 µM beziehungsweise 1,0 µM Paclitaxel behandelten BT-474-Zellen eine nur signifikant längere Verdopplungszeit auf (Verdopplung in  $3,00 \pm 0,00$  beziehungsweise  $3,10 \pm 0,24$  Tagen im Vergleich zum Wildtyp mit  $2,00 \pm 0,10$  Tagen), während zu Beginn gar kein positives Wachstum verzeichnet werden konnte.

## 5.2 Durchflusszytometrisch erstellte 6-Farb-Assays zur Quantifizierung der Oberflächenmarkerexpression von EMT-Markern auf mit Paclitaxel, Epirubicin und TGF-β1 behandelten Mammakarzinomzellen

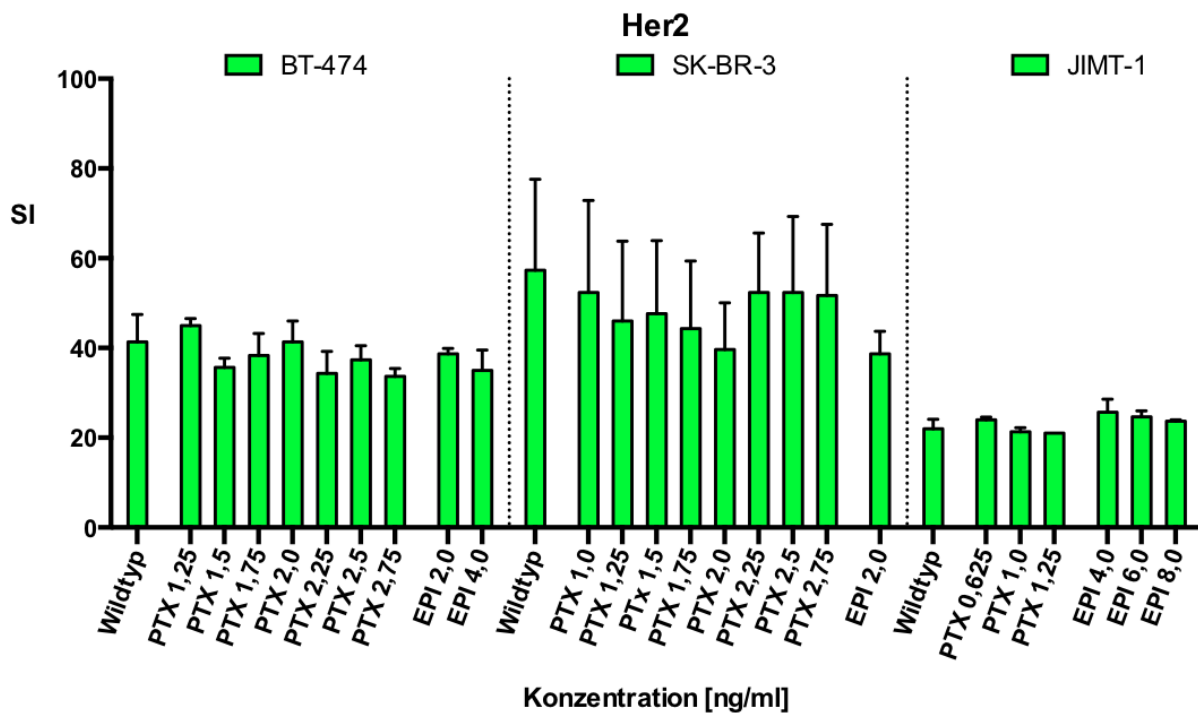
Die 6-Farb-Assays zur Bestimmung der Oberflächenmarkerexpression auf behandelten Zellen wurden wie in 2.1.2 und 4.3.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die langfristig mit Zytostatika behandelten Zellen, die kurzzeitig mit Paclitaxel behandelten BT-474-Zellen und die TGF-β1 behandelten Zellen jeweils mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen.

### 5.2.1 6-Farb-Assays der langfristig mit Zytostatika behandelten BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen

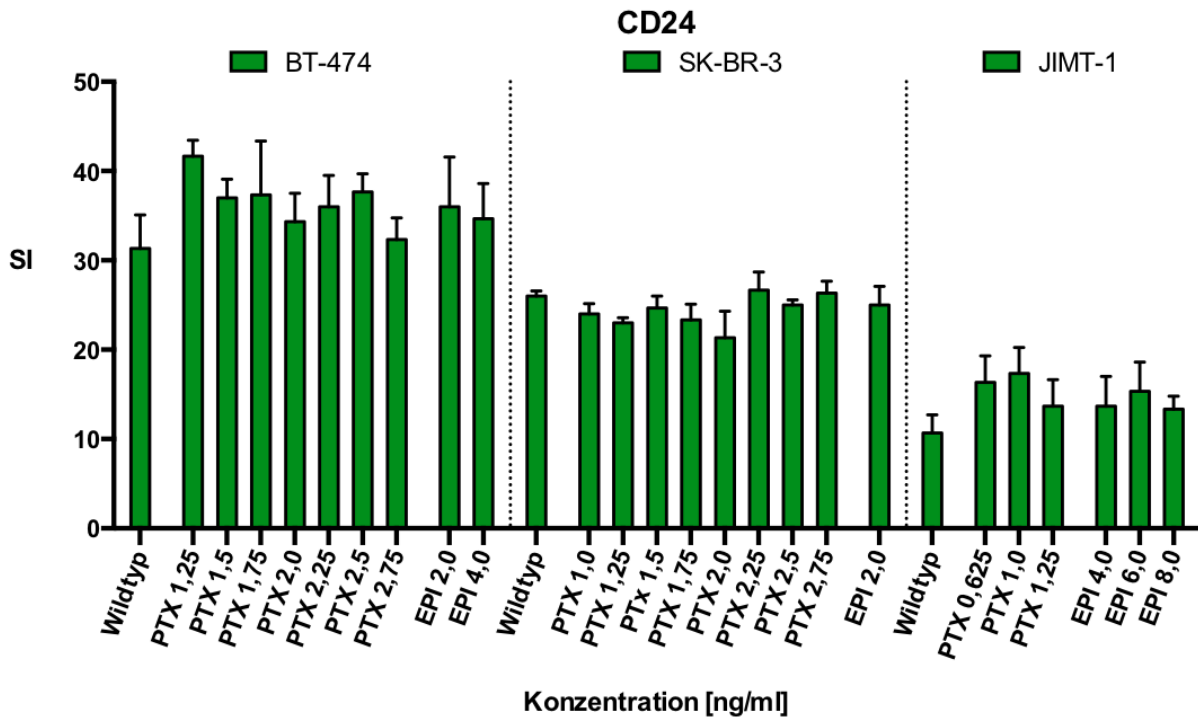
Gemessen wurden alle in aufsteigender Konzentration behandelten Zellen einer Zelllinie (je drei Messungen). Die Ergebnisse wurden in sechs verschiedenen Diagrammen dargestellt, wobei jedes Diagramm alle Ergebnisse zur Expression eines Oberflächenmarkermoleküls liefert. Die Auswahl der Farben soll das Fluoreszenzlicht der verwendeten Fluorochrome widerspiegeln. Auf der y-Achse ist der Stain-Index (SI) aufgetragen, der wie in 2.1.2 beschrieben berechnet wurde. Die x-Achse zeigt die Behandlung



der Zellen bezogen auf die jeweilige Zelllinie BT-474, SK-BR-3 beziehungsweise JIMT-1. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der linearen Regressionsberechnung im SPSS-Programm. Durch die Regressionsanalyse können Beziehungen einer abhängigen (Stain-Index) zu einer unabhängigen Variable (Konzentration der Zytostatika-Behandlung) dargestellt werden<sup>66</sup>. Es wird also festgestellt, ob ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration von Paclitaxel beziehungsweise Epirubicin mit der Höhe des Stain-Index und somit der Oberflächenmarkerexpression besteht.

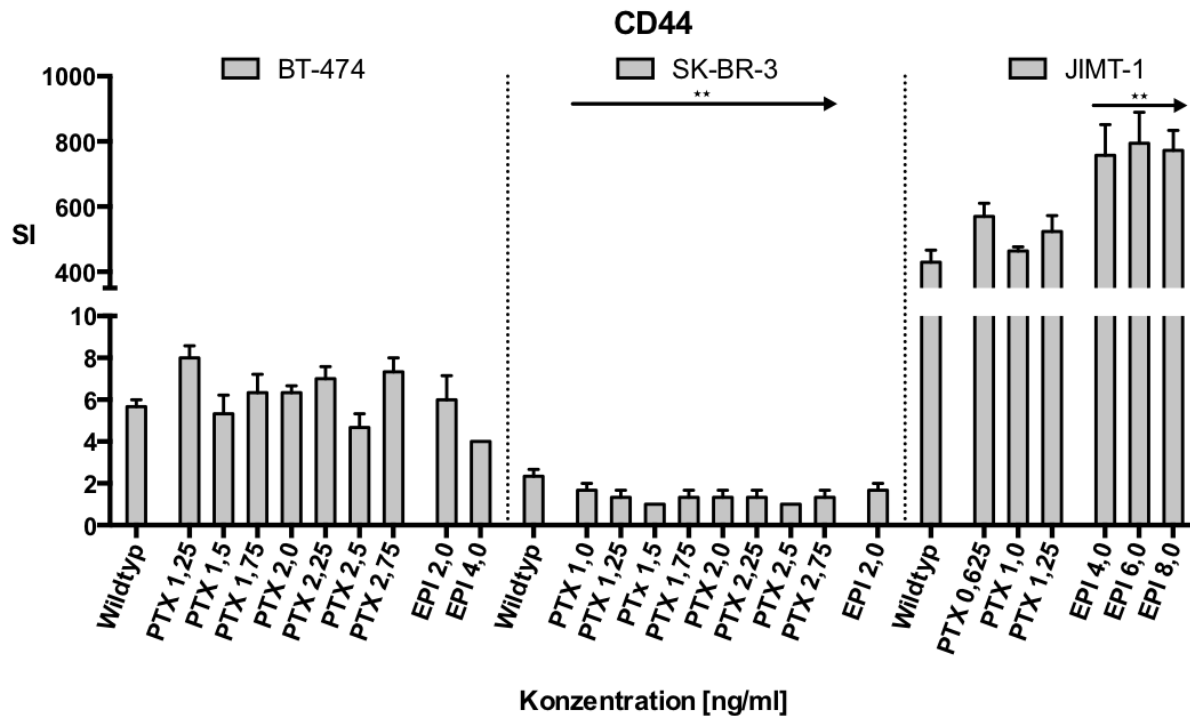


**Abbildung 17** Her2 Expression auf BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach unterschiedlicher langzeitiger Zytostatika Behandlung. Abkürzungen: SI = Stain-Index, Wildtyp = unbehandelte Kontrolle; PTX = Paclitaxel, EPI = Epirubicin. Deskriptive Statistik: dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$ , Signifikanz berechnet mittels linearer Regressionsanalyse in SPSS;



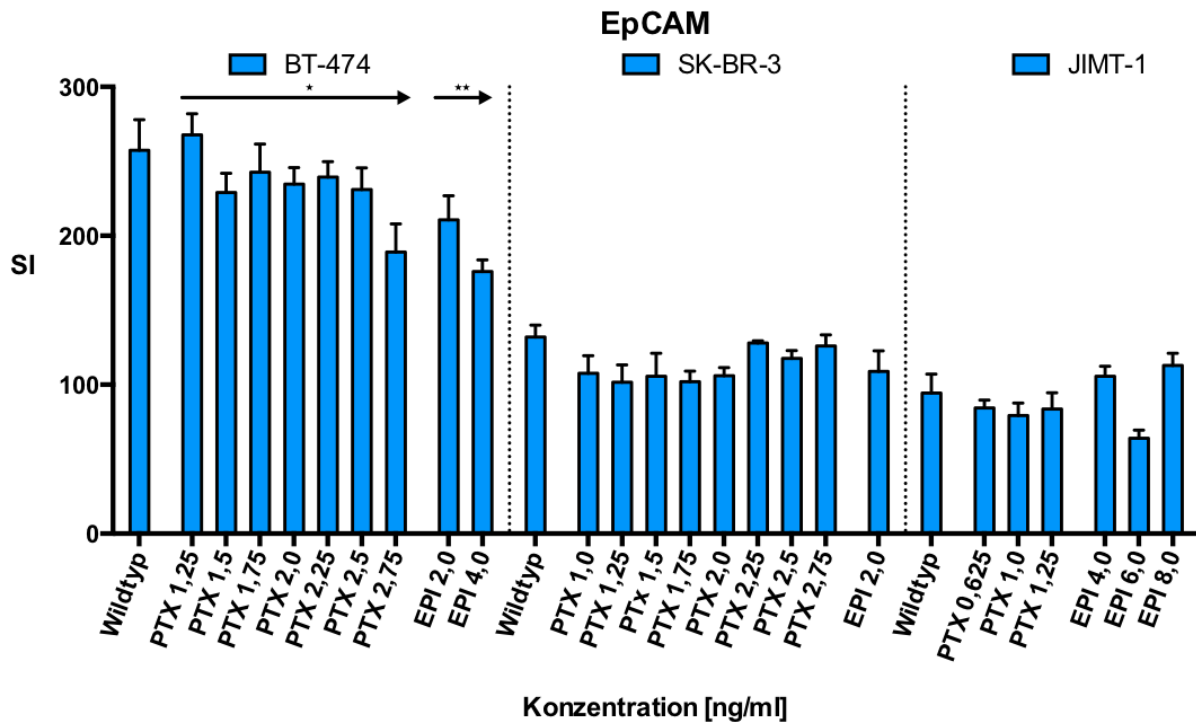
**Abbildung 18** CD24 Expression auf BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach unterschiedlicher langzeitiger Zytostatika Behandlung. Abkürzungen: SI = Stain-Index, Wildtyp = unbehandelte Kontrolle; PTX = Paclitaxel, EPI = Epirubicin. Deskriptive Statistik: dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$ , Signifikanz berechnet mittels linearer Regressionsanalyse in SPSS;

Bei den mit Paclitaxel und Epirubicin über längere Zeit behandelten Zellen ergab die Quantifizierung der Oberflächenmarkermoleküle Her2 (s. Abbildung 17) und CD24 (s. Abbildung 18) bei keiner der Zelllinien signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle.



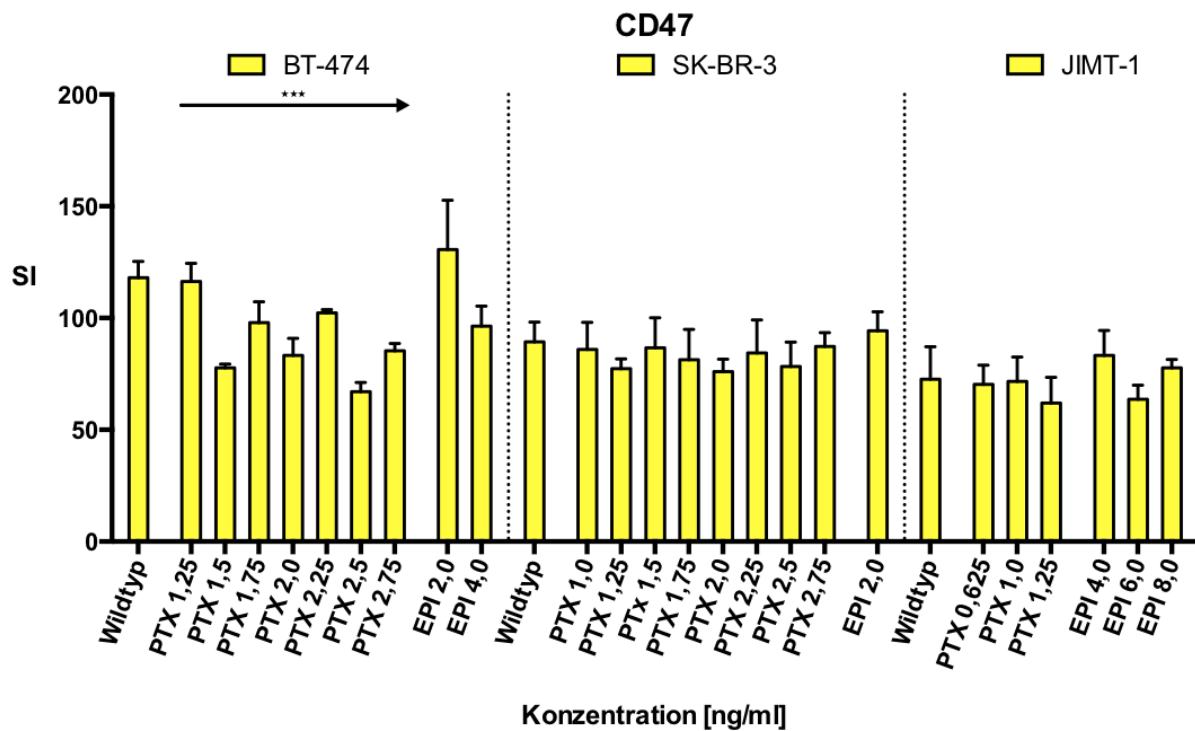
**Abbildung 19** CD44 Expression auf BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach unterschiedlicher langzeitiger Zytostatika Behandlung. Abkürzungen: SI = Stain-Index, Wildtyp = unbehandelte Kontrolle; PTX = Paclitaxel, EPI = Epirubicin; \*\* =  $p < 0,01$ ; → = signifikante Veränderung. Deskriptive Statistik: dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$ , Signifikanz berechnet mittels linearer Regressionsanalyse in SPSS;

Die Regressionsanalyse für die CD44-Stain-Indizes (s. Abbildung 19) im Verhältnis zur steigenden Behandlungskonzentration ergab für mit Paclitaxel behandelte SK-BR-3-Zellen einen sehr signifikant negativ linearen Zusammenhang ( $R^2 = 0,273$ ;  $p < 0,005$ ). Da die Werte der Stain-Indizes für CD44 der SK-BR-3-Zelllinie generell sehr niedrig sind, ist es fraglich, ob dieser Effekt berücksichtigt werden kann und wird es in dieser Arbeit auch nicht weiter. Gleichzeitig ergab die Regressionsberechnung für mit Epirubicin behandelte JIMT1-Zellen einen sehr signifikant positiv linearen Zusammenhang ( $R^2 = 0,527$ ;  $p < 0,008$ ).



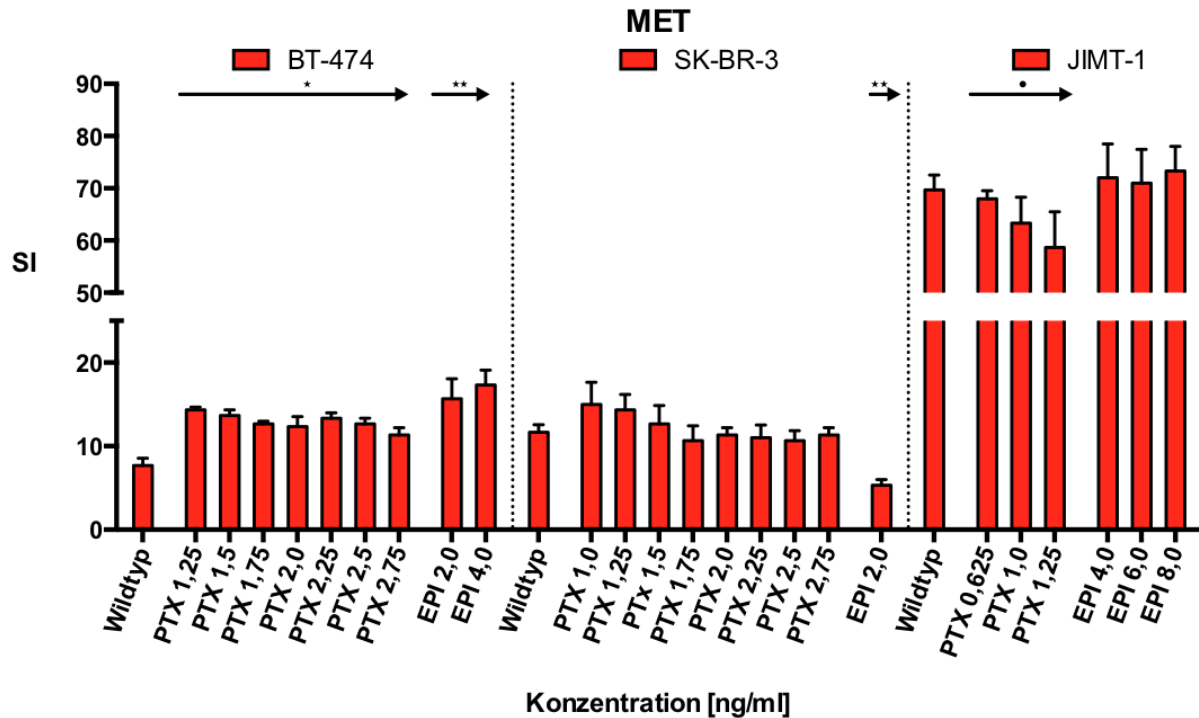
**Abbildung 20** EpCAM Expression auf BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach unterschiedlicher langzeitiger Zytostatika Behandlung. Abkürzungen: SI = Stain-Index, Wildtyp = unbehandelte Kontrolle; PTX = Paclitaxel, EPI = Epirubicin; \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ; → = signifikante Veränderung. Deskriptive Statistik: dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$ , Signifikanz berechnet mittels linearer Regressionsanalyse in SPSS;

Während bei den Zelllinien SK-BR-3 und JIMT-1 kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollen festgestellt werden konnte, sieht man bei BT-474-Zellen sowohl unter Paclitaxel- als auch unter Epirubicin-Langzeitbehandlung eine Abnahme der Stain-Indizes von EpCAM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (s. Abbildung 20). Zwischen EpCAM-Stain-Index und steigender Paclitaxel- beziehungsweise Epirubicin-Konzentration besteht dabei ein signifikant ( $R^2 = 0.251$ ;  $p < 0,013$ ) beziehungsweise sehr signifikant ( $R^2 = 0.685$ ;  $p < 0,006$ ) negativ linearer Zusammenhang.



**Abbildung 21** CD47 Expression auf BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach unterschiedlicher langzeitiger Zytostatika Behandlung. Abkürzungen: SI = Stain-Index, Wildtyp = unbehandelte Kontrolle; PTX = Paclitaxel, EPI = Epirubicin; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; → = signifikante Veränderung. Deskriptive Statistik: dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$ , Signifikanz berechnet mittels linearer Regressionsanalyse in SPSS;

Bei der Beobachtung des CD47-Oberflächenmarkermoleküls (s. Abbildung 21) lässt sich nur bei der Paclitaxel-Langzeitbehandlung der BT-474 Zellen eine signifikante Veränderung feststellen. Hier besteht ein hoch signifikant negativ linearer Zusammenhang zwischen Stain-Index und Behandlungskonzentration ( $R^2 = 0.379$ ;  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 22** c-MET Expression auf BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach unterschiedlicher langzeitiger Zytostatika Behandlung. Abkürzungen: SI = Stain-Index, Wildtyp = unbehandelte Kontrolle; PTX = Paclitaxel, EPI = Epirubicin; • =  $p < 0,1$ , \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ; → = signifikante Veränderung. Deskriptive Statistik: dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$ , Signifikanz berechnet mittels linearer Regressionsanalyse in SPSS;

Bei der Analyse der c-MET-Stain-Indizes (s. Abbildung 22) lassen sich je nach Zelllinie und Behandlung unterschiedliche Entwicklungen feststellen. Die Oberflächenmarkerexpression von c-MET auf BT-474 Zellen nimmt unter Behandlung mit Paclitaxel beziehungsweise Epirubicin zu. Dabei zeigt sich ein signifikant ( $R^2 = 0,213$ ,  $p < 0,023$ ) beziehungsweise ein sehr signifikant ( $R^2 = 0,642$ ,  $p < 0,009$ ) positiver linearer Zusammenhang zwischen Stain-Index und zunehmender Konzentration an Paclitaxel beziehungsweise Epirubicin. Bei der SK-BR-3-Zelllinie lässt sich nur unter Epirubicin-Behandlung eine signifikante Entwicklung feststellen - der Stain-Index verhält sich zur Epirubicin-Konzentration sehr signifikant linear ( $R^2 = 0,891$ ,  $p < 0,005$ ), er nimmt mit zunehmender Konzentration des Zytostatikums ab. JIMT-1 Zellen hingegen zeigen nur unter Langzeit-Paclitaxel-Therapie mit zunehmender Konzentration einen Trend zur Abnahme des Stain-Index von c-MET ( $R^2 = 0,265$ ,  $p < 0,087$ ) und somit von c-MET auf der Zelloberfläche.

**Tabelle 5** Durch FACS 6-Farb-Assays gemessene Oberflächenmoleküle auf BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach zytotoxischer Langzeit-, Kurzzeit- sowie TGF- $\beta$ 1-Behandlung. Dargestellt ist die veränderte Expression der Marker im Vergleich zur Kontrolle, außerdem ist auch der „erwartete Effekt“ von Epithelial-Mesenchymaler Transition auf die Expression der Marker dargestellt. Abkürzungen: LZ beziehungsweise KZ = langzeitige beziehungsweise kurzzeitige Behandlung, PTX = Paclitaxel, EPI = Epirubicin,  $\uparrow$  = Zunahme,  $\downarrow$  = Abnahme, - = kein signifikanter Effekt;

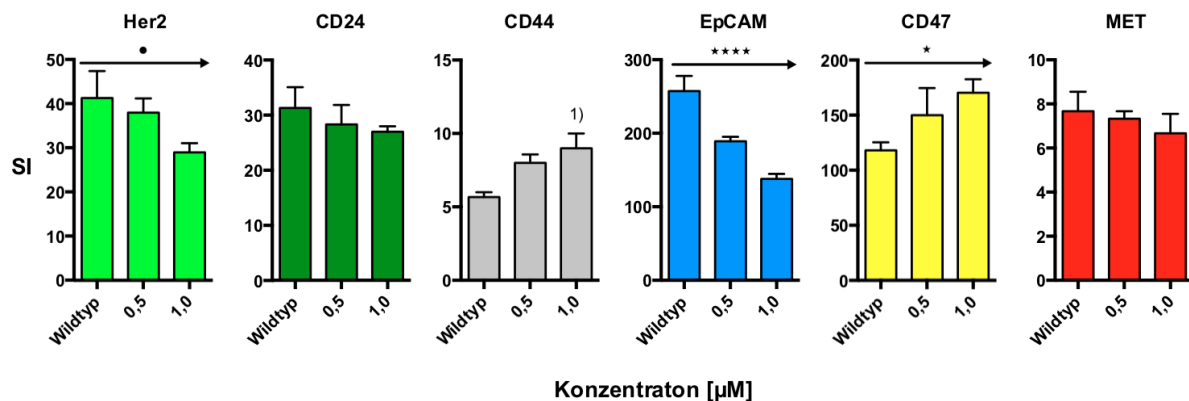
Marker	Erwarteter Effekt bei EMT	LZ PTX			LZ EPI			KZ PTX
		BT-474	SK-BR-3	JIMT-1	BT-474	SK-BR-3	JIMT-1	BT-474
Her2	$\uparrow$	-	-	-	-	-	-	$\downarrow$
CD24	$\downarrow$	-	-	-	-	-	-	-
CD44	$\uparrow$	-	-	-	-	-	$\uparrow$	-
EpCAM	$\downarrow$	$\downarrow$	-	-	$\downarrow$	-	-	$\downarrow$
CD47	$\uparrow$	$\downarrow$	-	-	-	-	-	$\uparrow$
c-MET	$\uparrow$	$\uparrow$	-	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$	-	-
Marker	Erwarteter Effekt bei EMT	TGF- $\beta$ 1						
		BT-474	SK-BR-3	JIMT-1				
Her2	$\uparrow$	-	-	-				
CD24	$\downarrow$	-	-	$\downarrow$				
CD44	$\uparrow$	-	-	-				
EpCAM	$\downarrow$	-	$\uparrow$	-				
CD47	$\uparrow$	-	-	-				
c-MET	$\uparrow$	-	-	-				

Die Tabelle 5 zeigt, dass sich die Oberflächenmarkermoleküle je nach Zelllinie und Behandlung unterschiedlich verhalten. Der erwartete Effekt, soll die veränderte Expression der Oberflächenmarkermoleküle aufzeigen, die angenommen wird, wenn Zellen EMT durchlaufen. Teils entwickeln sie sich wie erwartet: EpCAM wird auf der Oberfläche von BT-474-Zellen unter Paclitaxel- und Epirubicin-Behandlung herunterreguliert, CD44 wird auf mit Epirubicin behandelten JIMT-1 Zellen vermehrt exprimiert und mit Paclitaxel behandelte BT-474-Zellen tragen vermehrt c-MET auf ihrer Oberfläche. Teils verhalten sich die Marker unterschiedlich zur Erwartung: CD44 wird auf mit Paclitaxel behandelten SK-BR-3 Zellen herunterreguliert, mit Paclitaxel behandelte BT-474 Zellen tragen weniger CD47 auf ihrer Oberfläche und sowohl mit Paclitaxel behandelte JIMT-1 Zellen als auch mit Epirubicin behandelte SK-BR-3 Zellen exprimieren weniger c-MET auf der Oberfläche.

### 5.2.2 Durchflusszytometrisch erstellte 6-Farb-Assays zur Quantifizierung der Oberflächenmarker von BT-474 Zellen nach kurzzeitiger Paclitaxel Behandlung

Wie die Expressionsprofile der langfristig zytotoxisch behandelten Zellen wurden auch die der 48 Stunden langfristig zytotoxisch behandelten BT-474 Zellen einer linearen

Regressionsanalyse unterzogen. Dabei wurden auch hier die Ergebnisse in sechs Diagrammen aufgetragen, welche je einen Marker widerspiegeln.



**Abbildung 23** Her2, CD24, CD44, EpCAM, CD47 und c-MET Expression auf BT-474 Zellen nach 48-stündiger Paclitaxel-Behandlung. Abkürzungen: SI = Stain-Index, Wildtyp = unbehandelte Kontrolle; 1) = nur 2 Werte; • =  $p < 0,1$ , \* =  $p < 0,05$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ; → = signifikante Veränderung. Deskriptive Statistik: dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$ , Signifikanz berechnet mittels linearer Regressionsanalyse in SPSS;

Während man bei CD24, CD44 und c-MET nach 48-Stunden Behandlung keine signifikanten Veränderungen erkennen kann, lässt sich feststellen, dass die Stain-Indizes von Her2 beziehungsweise EpCAM in negativ linearem Zusammenhang mit der Paclitaxel-Konzentration stehen. Dabei lässt sich bei Her2 ein Trend zur Abnahme des Moleküls ( $R^2 = 0,410$ ,  $p < 0,063$ ) und bei EpCAM eine hoch signifikant geringere Expression des Markers ( $R^2 = 0,862$ ,  $p < 0,001$ ) auf der Zelloberfläche ansehen. Die Expression von CD47 steht signifikant in positiv-linearem Zusammenhang mit der Paclitaxel-Konzentration ( $R^2 = 0,455$ ,  $p < 0,046$ ). Bis auf die Herunterregulierung von Her2 entsprechen diese Entwicklungen unter Hochdosis-Zytostatika-Behandlung den Veränderungen, die man erwarten würde, wenn Zellen EMT durchlaufen (s. Tabelle 5).

### 5.2.3 Durchflusszytometrisch erstellte 6-Farb-Assays zur Quantifizierung der Oberflächenmarkermoleküle der TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen

Zur Kontrolle für die Assays der langzeitigen und kurzzeitigen zytotoxischen Behandlungen wurden BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen eine Woche beziehungsweise sechs Wochen lang mit TGF- $\beta$ 1, einem Wachstumsfaktor, den man mit EMT- und Stammzellsignalwegen in Verbindung bringt, behandelt, um festzustellen, ob sich die erwarteten EMT-Effekte (s. Tabelle 5) auf den behandelten Zellen messen lassen. Es wurde auch hier eine Regressionsanalyse durchgeführt (unabhängige Variable: TGF- $\beta$ 1-Behandlungsdauer, abhängige Variable: Stain-Index). Während bei BT-474 Zellen kein Unterschied festgestellt werden konnte, zeigte der EpCAM-Stain-Index der SK-BR-3 Zellen



unter Behandlung einen signifikant positiven linearen Zusammenhang zur Behandlungsdauer mit TGF- $\beta$ 1 ( $R^2 = 0,913$ ,  $p < 0,011$ ) und der CD24-Stain-Index auf behandelten JIMT-1 Zellen einen Trend zur Abnahme ( $R^2 = 0,707$ ,  $p < 0,076$ ). Die Zunahme von EpCAM auf der Oberfläche von SK-BR-3 Zellen widerspricht der Erwartung, dass unter EMT EpCAM auf der Zelloberfläche herunterreguliert wird. Die Abnahme von CD24 auf JIMT-1 lässt sich mit den Erwartungen vereinbaren.

### **5.3 Proteinchemische Darstellung von EMT-Markern nach kurzzeitiger beziehungsweise langzeitiger Behandlung von Mammarkarzinomzellen mit Paclitaxel, Epirubicin und TGF- $\beta$ 1**

#### **5.3.1 Westernblots der Zytostatika behandelten Zellen**

Die langfristig und kurzzeitig mit Zytostatika behandelten BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen wurden proteinchemisch auf die quantitative Expression EMT-spezifischer Proteine untersucht. Es wurden dafür von den Langzeit-Zytostatika-behandelten Zellen die Zellen, die mit der höchsten beziehungsweise zweit-höchsten Konzentration behandelt wurden, verwendet. Es wurden acht verschiedene Westernblots zur Untersuchung acht verschiedener Proteine durchgeführt: Vimentin, N-Cadherin,  $\beta$ -Catenin, Snail, Slug, TCF8/ZEB1 sind mesenchymale, E-Cadherin und ZO-1 epitheliale Marker. Verändern sich die Zellen durch EMT unter Zytostatika-Behandlung, würde man eine Zunahme der mesenchymalen und eine Abnahme der epithelialen Marker erwarten. Gleichzeitig wurde pro Westernblot mindestens eine Kontrolle aufgetragen, die das zu untersuchende Protein laut Hersteller des EMT-Antikörper-Kits exprimiert.

Die Westernblots wurden je Protein nur ein Mal durchgeführt, sodass keine statistische Analyse durchgeführt werden konnte. Quantitative Unterschiede wurden mit *ImageQuant TL* berechnet und in Diagrammen mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 6* aufgetragen.

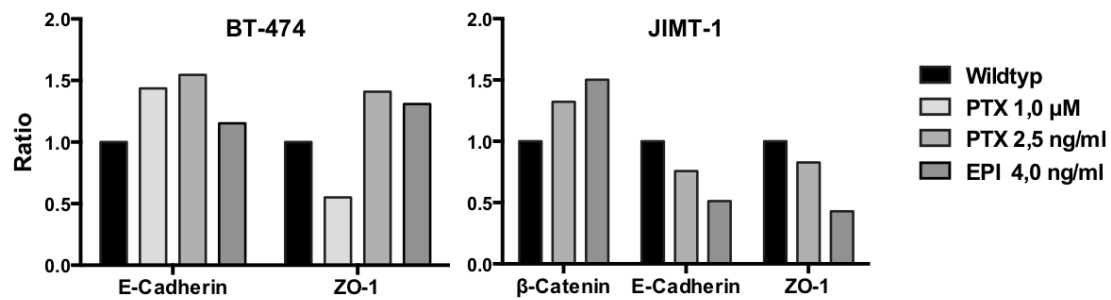
Bei der Untersuchung der Proteine E-Cadherin, ZO-1 und  $\beta$ -Catenin zeigen BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 bei 42 kDa eine Bande für das Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. Die stärksten Positivkontrollen für die drei untersuchten Proteine - MCF7 für E-Cadherin und ZO-1, N1 für  $\beta$ -Catenin - zeigen ebenso auf erwarteter Höhe eine Bande, weshalb von einer erfolgreichen technischen Durchführung der Westernblots ausgegangen werden kann. ZO-1 und  $\beta$ -Catenin haben bei allen Zelllinien eine Bande. E-Cadherin zeigt nur bei BT-474 und JIMT-1 ein Signal, SK-BR-3 zeigt für E-Cadherin kein Signal. Hiraguri et al. konnten 1998 eine fehlende

Expression von SK-BR-3 ebenso feststellen und erklären dies durch eine Deletion von CDH1 auf den Exonen 6 und 12<sup>67</sup>.

Bei behandelten Zellen der BT-474-Zelllinie kommt es durchweg zu einem Anstieg der E-Cadherin-Expression im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Dabei steigen die errechneten Ratios unter Paclitaxel-Behandlung mit 1,0  $\mu$ M über 48 Stunden beziehungsweise 2,5 ng/ml über fünf Monate von 1,0 auf 1,44 beziehungsweise 1,55 an. Unter Epirubicin-Langzeitbehandlung mit 4,0 ng/ml nimmt die Ratio von 1,0 auf 1,15 leicht zu. Bei der Expression von ZO-1 lässt sich unter Hochdosis-Paclitaxel-Behandlung mit 1,0  $\mu$ M eine Abnahme der Ratio auf 0,55 beobachten. Unter Langzeit-Paclitaxel- beziehungsweise Epirubicin-Behandlung steigt die Ratio auf 1,41 beziehungsweise 1,31. Es lässt sich bei den behandelten BT-474-Zellen keine veränderte  $\beta$ -Catenin-Expression erkennen. Dabei spricht nur die Abnahme von ZO-1 unter 1  $\mu$ M Paclitaxel-Therapie für die Entwicklung eines mesenchymalen Charakters, alle anderen Beobachtungen sprechen für einen vermehrt epithelialen Charakter der Zellen.

Behandelte JIMT-1 Zellen zeigen sowohl unter Langzeit-Paclitaxel-Behandlung mit 1,25 ng/ml und Langzeit-Epirubicin-Behandlung mit 8,0 ng/ml eine Abnahme der E-Cadherin und ZO-1-Expression sowie eine Zunahme des  $\beta$ -Catenin-Proteins. Die E-Cadherin-Ratio fällt dabei von 1,0 auf 0,76 unter Paclitaxel beziehungsweise von 1,0 auf 0,51 unter Epirubicin Behandlung. Gleichzeitig fällt die ZO-1-Ratio unter Paclitaxel- beziehungsweise Epirubicin-Behandlung von jeweils 1,0 auf 0,83 beziehungsweise 0,43. Bei  $\beta$ -Catenin lässt sich je unter Paclitaxel- beziehungsweise Epirubicin-Behandlung ein Anstieg der Ratio von 1,0 auf 1,32 beziehungsweise 1,50 beobachten. Diese Beobachtungen lassen einen zunehmend mesenchymalen Charakter der Zellen vermuten.

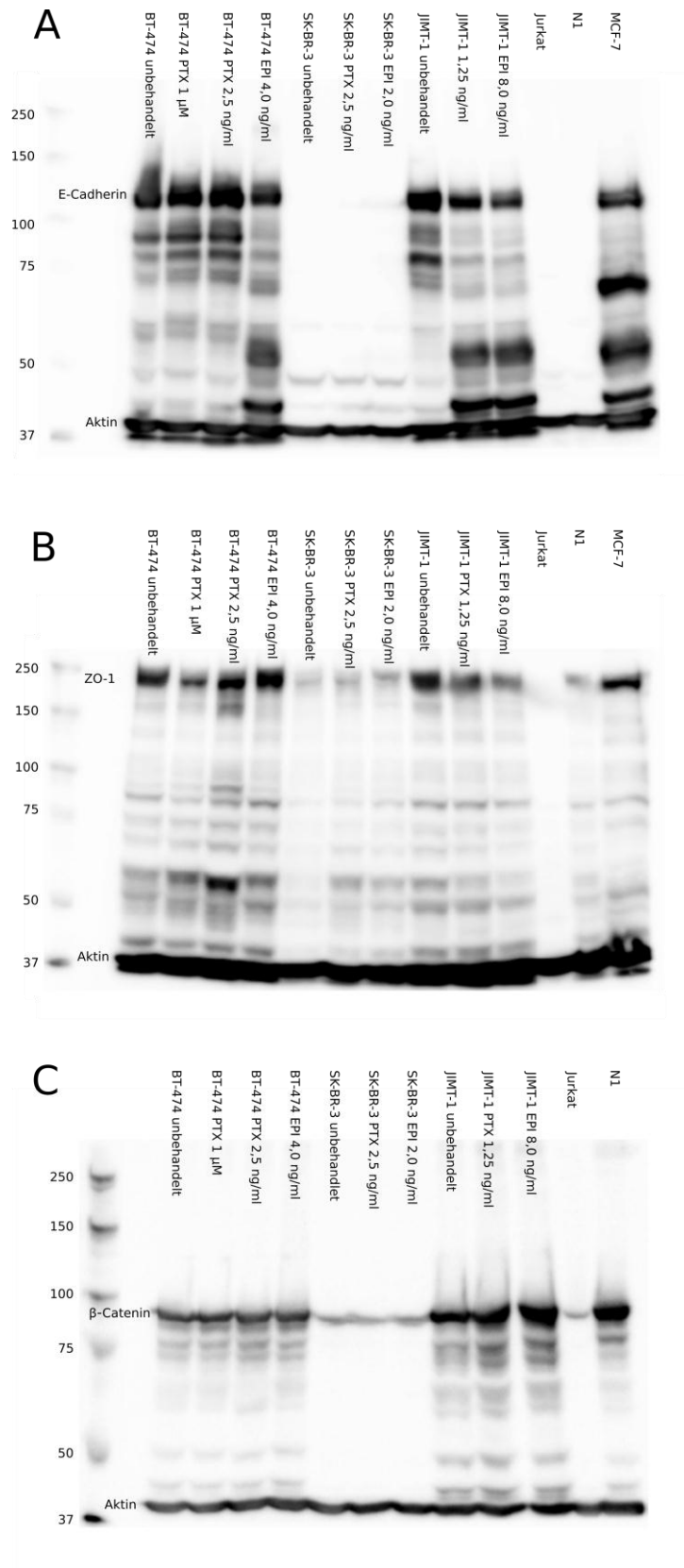
SK-BR-3-Zellen zeigen bei der Untersuchung der Proteine E-Cadherin, ZO-1 und  $\beta$ -Catenin keine Veränderung der Signalstärke der entsprechenden Banden unter Behandlung.



**Abbildung 24** Ergebnisse der Westernblots zur Untersuchung der Expression von  $\beta$ -Catenin, E-Cadherin und ZO-1 auf BT-474 und JIMT-1 Zellen nach unterschiedlicher Zytostatika Behandlung. Abkürzungen: Wildtyp = unbehandelte Kontrolle, PTX 1,0  $\mu$ M = 48-Stunden Behandlung mit 1,0  $\mu$ M Paclitaxel, PTX 2,5 ng/ml = langzeitige Behandlung mit 2,5 ng/ml Paclitaxel, EPI 4,0 ng/ml = langzeitige Behandlung mit 4,0 ng/ml Epirubicin; n=1; auf der x-Achse sind die gemessenen EMT-Marker aufgetragen;

**Tabelle 6** Durch Westernblot gemessene Proteine der BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach zytotoxischer Langzeit-, Kurzzeit- sowie TGF- $\beta$ 1-Behandlung. Dargestellt ist die veränderte Expression der Marker im Vergleich zur Kontrolle, außerdem ist auch der „erwartete Effekt“ von EMT auf die Expression der Marker dargestellt. Abkürzungen: LZ beziehungsweise KZ = langzeitige beziehungsweise kurzzeitige Behandlung, PTX = Paclitaxel, EPI = Epirubicin,  $\uparrow$  = Zunahme,  $\downarrow$  = Abnahme, - = kein signifikanter Effekt;

Marker	Erwarteter Effekt bei EMT	LZ PTX			LZ EPI			KZ PTX
		BT-474	SK-BR-3	JIMT-1	BT-474	SK-BR-3	JIMT-1	BT-474
E-Cadherin	$\downarrow$	$\uparrow$	-	$\downarrow$	$\uparrow$	-	$\downarrow$	$\uparrow$
ZO-1	$\downarrow$	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	-	-	$\downarrow$
$\beta$ -Catenin	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	-
Snail	$\uparrow$	-	-	-	-	-	-	-
Slug	$\uparrow$	-	-	-	-	-	-	-
Vimentin	$\uparrow$	-	-	-	-	-	-	-
N-Cadherin	$\uparrow$	-	-	-	-	-	-	-
TCF8/ZEB1	$\uparrow$	-	-	-	-	-	-	-
Marker	Erwarteter Effekt bei EMT	TGF- $\beta$ 1						
		BT-474	SK-BR-3	JIMT-1				
E-Cadherin	$\downarrow$	$\downarrow$	-	$\uparrow$				
ZO-1	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$				
$\beta$ -Catenin	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$				
Snail	$\uparrow$	-	-	-				
Slug	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$				
Vimentin	$\uparrow$	-	-	-				
N-Cadherin	$\uparrow$	-	-	-				
TCF8/ZEB1	$\uparrow$	-	-	-				



**Abbildung 25** Westernblots zur Untersuchung der Marker E-Cadherin, ZO-1 und  $\beta$ -Catenin auf den BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach unterschiedlicher Zytostatika Behandlung . Molekulares Gewicht der Marker: E-Cadherin = 135 kDa, ZO-1 = 220 kDa,  $\beta$ -Catenin = 92 kDa; Kontrolle Aktin = 42 kDa; Abkürzungen: PTX 1  $\mu$ M = 48-Stunden Behandlung mit 1,0  $\mu$ M Paclitaxel, PTX 1,25 ng/ml = langzeitige Behandlung mit 1,25 ng/ml Paclitaxel, PTX 2,5 ng/ml = langzeitige Behandlung mit 2,5 ng/ml Paclitaxel, EPI 2,0 ng/ml = langzeitige Behandlung mit 2,0 ng/ml Epirubicin, EPI 4,0 ng/ml = langzeitige Behandlung mit 4,0 ng/ml, EPI 8,0 ng/ml =

langzeitige Behandlung mit 8,0 ng/ml; Links ist jeweils der Standard aufgetragen (kDa). A: E-Cadherin; B: ZO-1; C:  $\beta$ -Catenin;

Die Untersuchung der quantitativen Expression der übrigen Marker ergab bei den behandelten Zellen im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle keinen Unterschied. Es kann dabei von einer technisch erfolgreich durchgeführten Detektion der Marker ausgegangen werden: Der Marker Snail wird von jeder Zelllinie und der Positivkontrolle N1 schwach exprimiert, das Referenzprotein  $\beta$ -Aktin zeigt bei 42 kDa ein starkes Signal; Slug zeigt bei allen JIMT-1-Zellen und bei der Positivkontrolle N1 ein starkes Signal, BT-474 und SK-BR-3 exprimieren das Protein sehr schwach, das Referenzprotein  $\beta$ -Aktin ist nachweisbar; Das 57 kDa große Vimentin hat vermeintlich bei der Positivkontrolle N1 auf entsprechender Höhe eine Bande, bei den restlichen Zelllinien kann es sehr schwach bis gar nicht nachgewiesen werden, das Referenzprotein  $\beta$ -Aktin zeigt bei 42 kDa eine Bande; N-Cadherin lässt sich nur bei der Positivkontrolle N1 detektieren, das Referenzprotein  $\beta$ -Tubulin ist bei 52 kDa nachweisbar; TCF8/ZEB1 lässt sich bei den Positivkontrollen Jurkat und N1 im Gegensatz zu den Zelllinien BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 detektieren, das Referenzprotein  $\beta$ -Aktin hat bei 42 kDa ein Signal.

### **5.3.2 Westernblots der TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen**

Zusätzlich zu den mit Zytostatika behandelten Zellen wurden auch die über eine Woche mit TGF- $\beta$ 1 behandelten Kontrollen der Zelllinien BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 proteinchemisch untersucht. Hierfür wurden weitere acht Westernblots zur Untersuchung der acht EMT-Marker durchgeführt. Dabei wurden je behandelte Zellen und eine unbehandelte Kontrolle jeder Zelllinie aufgetragen, auf eine Positivkontrolle wurde bei diesen Blots verzichtet.

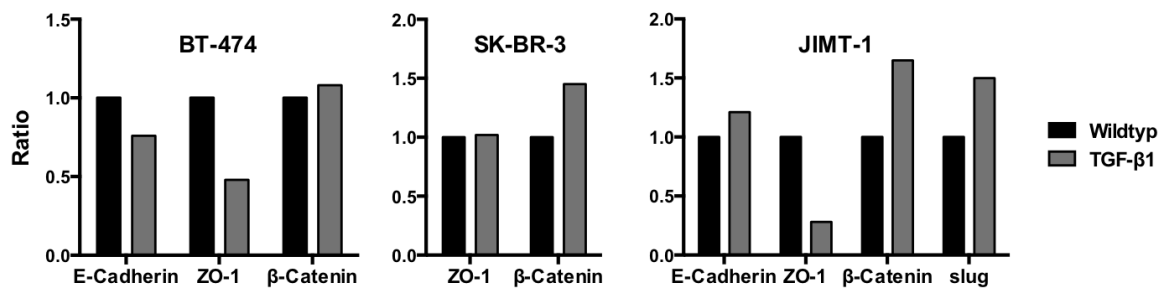
Eine offensichtliche Veränderung des Signals nach Behandlung konnte bei den Proteinen E-Cadherin, ZO-1,  $\beta$ -Catenin und Slug vernommen werden. Dabei wird E-Cadherin, wie oben bereits erwähnt, nur von BT-474 und JIMT-1 exprimiert. ZO-1 und  $\beta$ -Catenin zeigen bei allen Zelllinien eine starke Bande, Slug hingegen wird nur von JIMT-1 stark exprimiert, BT-474 und SK-BR-3 zeigen aber dennoch eine leichte Färbung der Bande. Das Referenzprotein  $\beta$ -Aktin zeigt bei 42 kDa bei jedem Western Blot ein Signal, sodass von einer korrekten Detektion der Proteine ausgegangen werden kann.

Bei BT-474-Zellen kommt es unter TGF- $\beta$ 1-Behandlung zur Abnahme von epithelialen und Zunahme von mesenchymalen Markern: die Ratios von E-Cadherin und ZO-1 fallen von 1,0

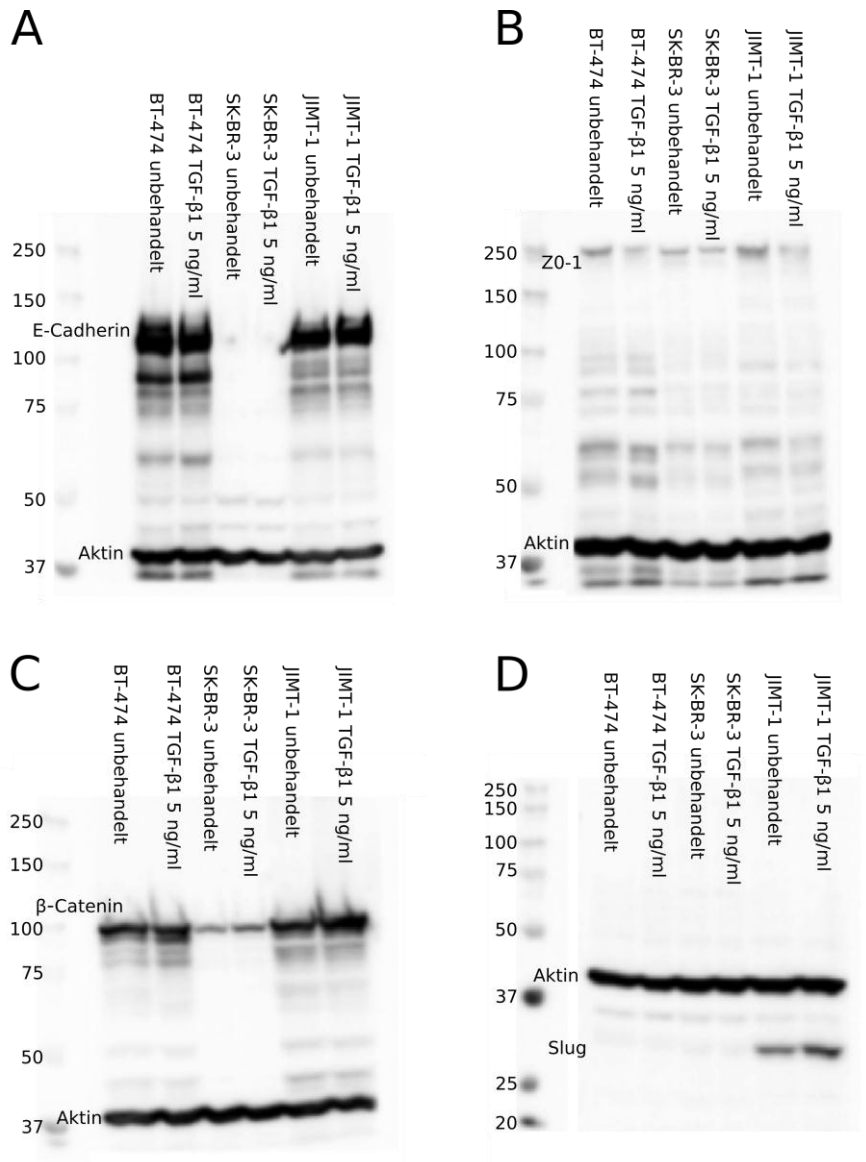
auf 0,76 beziehungsweise 0,48; die  $\beta$ -Catenin Ratio steigt auf 1,08. Die Slug-Expression bleibt unverändert niedrig.

Bei behandelten SK-BR-3-Zellen steigt die ZO-1-Ratio auf 1,02 sehr leicht an, während die Ratio für  $\beta$ -Catenin von 1,0 auf 1,45 eine starke Zunahme zeigt.

Während es unter TGF- $\beta$ 1-Behandlung zur Zunahme der E-Cadherin-Ratio auf 1,21 kommt, exprimieren JIMT-1-Zellen nach Behandlung mit einer Abnahme der Ratio von 1,0 auf 0,28 sehr viel weniger ZO-1. Die mesenchymalen Marker  $\beta$ -Catenin und Slug erlangen nach TGF- $\beta$ 1-Therapie eine verstärkte Präsenz mit einer Zunahme ihrer Ratio auf 1,65 beziehungsweise 1,5.



**Abbildung 26** Ergebnisse Westernblots zur Untersuchung der Expression von E-Cadherin, ZO-1,  $\beta$ -Catenin und Slug auf BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung. Abkürzungen: Wildtyp = unbehandelte Kontrolle; TGF- $\beta$ 1 = nach einer Woche Behandlung mit 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1; n=1; auf der x-Achse sind die gemessenen EMT-Marker aufgetragen;



**Abbildung 27** Westernblots zur Untersuchung der Expression von E-Cadherin, ZO-1,  $\beta$ -Catenin und Slug auf BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nach einer Woche 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 Behandlung. Molekulares Gewicht der Marker: E-Cadherin = 135 kDa, ZO-1 = 220 kDa,  $\beta$ -Catenin = 92 kDa, Slug = 30 kDa; Kontrolle Aktin = 42 kDa; A: E-Cadherin; B: ZO-1; C:  $\beta$ -Catenin; D: Slug;

#### 5.4 Mammosphere-Assays unter verschiedenen Paclitaxel-Behandlungen

Von den über einen längeren Zeitraum mit Paclitaxel behandelten BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen sowie von den über 48 Stunden mit hoher Dosis Paclitaxel behandelten BT-474 Zellen wurden wie in 4.2 beschrieben sogenannte *spheres* als *Dilution*-Assays angesetzt. Dabei wurde von den langfristig Paclitaxel behandelten Zellen jeweils ein Assay unter Fortsetzung der Zytostatika Behandlung und ein Assay ohne Zytostatika Zugabe angesetzt, um einen möglichen Unterschied zwischen Zugabe und Weglassen der Zytostatika im *sphere*-Assay erfassen zu können. Zur Untersuchung der langfristig zytotoxisch behandelten Zelllinien wurden jene behandelten Zellen verwendet, die in der

Standardzellkultur eine annähernd gleich starke Proliferation wie die jeweilige unbehandelte Kontrolle aufwiesen: mit 1,5 ng/ml Paclitaxel behandelte BT-474- und SK-BR-3-Zellen und mit 1,0 ng/ml Paclitaxel behandelte JIMT-1-Zellen. Zusätzlich wurde für jedes Assay eine unbehandelte Kontrolle mitaufgetragen. Die *sphere*-Daten (Anzahl und Durchmesser) wurden an Tag 4 und Tag 12 nach Aussaat der Zellen erhoben.

Analysiert wurde zum einen die *sphere*-Anzahl bei gleicher Aussaat (500, 100, 50 oder 10 Zellen pro *well*) und gleichem Tag (Tag 4 oder Tag 12 nach Aussaat) einer Zelllinie (BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1) bei unterschiedlicher Behandlung (*spheres* der Langzeit-Paclitaxel-behandelten Zellen mit beziehungsweise ohne Paclitaxel-Zusatz versus der unbehandelten Kontrolle; *spheres* der 48-Stunden-Paclitaxel-behandelten BT-474-Zellen versus unbehandelter BT-474 Zellen;).

Zum anderen wurden je die *sphere*-Anzahl und der durchschnittliche *sphere*-Durchmesser bei gleicher Aussaat und gleicher Behandlung einer Zelllinie an den Messtagen Tag 4 und Tag 12 nach Aussaat miteinander verglichen.

#### **5.4.1 BT-474 unter langerzeitiger Paclitaxel Behandlung: *sphere*-Anzahl und -Durchmesser**

##### **5.4.1.1 BT-474 Tag 4, *sphere*-Anzahl**

Während bei einer Aussaat von 500, 100 beziehungsweise 50 unterschiedlich behandelte BT-474-Zellen keine merklichen Veränderungen in der Anzahl der *spheres* festgestellt werden konnten, waren bei einer Aussaat von 10 Zellen pro *well* signifikante Unterschiede zu erkennen. Für die *spheres* gab es einen Haupteffekt der Paclitaxel-Behandlung ( $F(2,14) = 9,882$ ;  $p < 0,002$ ;  $\eta^2 = 0,585$ ), der zeigte dass die Anzahl der *spheres* behandelte Zellen ohne Paclitaxel ( $1,25 \pm 0,71$ ) und *spheres* behandelte Zellen mit Paclitaxel im Ansatz ( $2,25 \pm 1,49$ ) im Vergleich zu jener der unbehandelten Zellen ( $0,25 \pm 0,71$ ) zunahm. Post-hoc gepaarte T-Tests zeigten, dass sich alle Bedingungen signifikant voneinander unterschieden (alle  $t \geq -2,00$ ;  $p \leq 0,086$ ).

##### **5.4.1.2 BT-474 Tag 12, *sphere*-Anzahl**

Während bei der Aussaat von 100, 50 beziehungsweise 10 unterschiedlich behandelte BT-474-Zellen pro *well* keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der *spheres* pro *well* festgestellt werden konnten, waren bei der Aussaat von 500 Zellen pro *well* merkliche Veränderungen erkennbar. Für die *spheres* gab es einen Haupteffekt der Paclitaxel-



Behandlung ( $F(2,14) = 6,006$ ;  $p < 0,013$ ;  $\eta^2 = 0,462$ ), der zeigte dass die Anzahl der *spheres* behandelter Zellen ohne Paclitaxel ( $1,50 \pm 0,76$ ) und *spheres* behandelter Zellen mit Paclitaxel ( $2,63 \pm 1,41$ ) im Ansatz im Vergleich zu der Anzahl der *spheres* unbehandelter Zellen ( $1,00 \pm 0,00$ ) zunahm. Post-hoc gepaarte T-Tests zeigten, dass nur die sich unter konstanter Paclitaxel-Behandlung befindenden Zellen signifikant mehr *spheres* bildeten als der Wildtyp ( $t = -3,265$ ;  $p = 0,014$ ).

#### **5.4.1.3 BT-474 Vergleich Tag 4 und Tag 12, *sphere*-Anzahl und -Durchmesser**

Zwischen Tag 4 und Tag 12 sank die Anzahl der *spheres* bei ursprünglicher Aussaat von 500 BT-474 Zellen pro *well*. Hoch signifikant war dieser Effekt bei unbehandelten Zellen ( $p = 0,002$ ) und signifikant bei behandelten Zellen ohne Paclitaxel im Ansatz ( $p = 0,038$ ). Bei der Aussaat von 100 Zellen sank zwischen Tag 4 und Tag 12 die Anzahl der *spheres* (hoch signifikant bei unbehandelten Zellen ( $p = 0,002$ ) und signifikant bei Zellen mit Paclitaxel im Ansatz ( $p = 0,041$ ), Zellen ohne Paclitaxel im Ansatz zeigten einen Trend ( $p = 0,06$ )). Bei der Aussaat von 50 BT-474 Zellen ließen sich zwischen Tag 4 und Tag 12 keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der *spheres* feststellen. Bei der Aussaat von 10 BT-474 Zellen kam es zwischen Tag 4 und Tag 12 zu einer signifikanten Zunahme der *spheres* in der unbehandelten Kontrolle. Bei allen gemessenen *spheres* kam es zur Durchmesser-Zunahme über der Zeit. (s.Tabelle 7)

BT-474		500			100			50			10		
		WT	Ohne	mit	WT	ohne	mit	WT	ohne	mit	WT	ohne	mit
n	Tag 4	2,88 ± 1,55	2,63 ± 0,74	2,88 ± 1,36	2,38 ± 0,52	2,25 ± 1,58	3,00 ± 1,85	2,25 ± 1,75	2,25 ± 0,89	2,88 ± 1,55	0,25 ± 0,71	1,13 ± 0,71	2,25 ± 1,49
	Tag 12	1,00 ± 0,00	1,50 ± 0,76	2,63 ± 1,41	1,25 ± 0,46	1,00 ± 0,00	1,25 ± 0,46	1,38 ± 0,52	1,63 ± 0,92	1,63 ± 1,19	1,13 ± 0,64	1,13 ± 0,64	1,38 ± 0,52
	p < 0,05	↓0,002	↓0,038	-	↓0,002	(↓0,06)	↓0,041	-	-	-	↑0,006	-	-
Ø	Tag 4	120,08	129,91	131,21	87,75	88,27	103,74	74,38	82,88	78,84	40,13	65,02	56,78
	Tag 12	288,67	232,08	195,23	161,17	186,06	197,91	112,52	116,38	126,13	68,28	84,44	79,84
	%	↑141%	↑79%	↑49%	↑84%	↑111%	↑91%	↑51%	↑40%	↑60%	↑70%	↑30%	↑41%

**Tabelle 7** Vergleich der sphere Ergebnisse (Anzahl und Durchmesser) der Aussaat von 500, 100, 50 und 10 BT-474 Zellen zwischen Tag 4 und Tag 12 nach Aussaat. Abkürzungen: WT = unbehandelte Kontrolle, ohne = behandelte Zellen, aber ohne Paclitaxel im Ansatz, mit = behandelte Zellen mit 1,5 ng/ml Paclitaxel im Ansatz. ↑ beziehungsweise ↓ = Zu- beziehungsweise Abnahme zwischen Tag 4 und Tag 12, - = nicht signifikant. n beziehungsweise Ø = Anzahl beziehungsweise Durchmesser der spheres. Statistik: Anzahl der spheres Tag 4 vs. Tag 12 Signifikanz berechnet durch T-Tests, Anzahl spheres dargestellt als  $\mu \pm \sigma$ ; Durchmesser spheres deskriptiv nur Mittelwert angegeben.

## **5.4.2 SK-BR-3 unter langzeitiger Paclitaxel Behandlung: *sphere*-Anzahl und -Durchmesser**

### **5.4.2.1 SK-BR-3 Tag 4, *sphere*-Anzahl**

Bei den Langzeit-Paclitaxel-behandelten SK-BR-3-Zellen konnte in den *Dilution*-Assays kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Auch die *sphere*-Ansätze der behandelten Zellen mit und ohne fortlaufender Zytostatika Behandlung ergaben keine Veränderung der *sphere*-Anzahl.

### **5.4.2.2 SK-BR-3 Tag 12, *sphere*-Anzahl**

Auch am zweiten Messtag konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der *spheres* der behandelten und der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden.

### **5.4.2.3 SK-BR-3 Vergleich Tag 4 und Tag 12, *sphere*-Anzahl und -Durchmesser**

Bei der Aussaat von 500 Zellen ließ sich im Vergleich Tag 12 zu Tag 4 keine signifikante Veränderung in der *sphere*-Anzahl feststellen. Es kam bei der Aussaat von 100 Zellen zwischen Tag 4 und Tag 12 zur signifikanten *sphere*-Zunahme bei behandelten Zellen ohne Paclitaxel im *sphere*-Ansatz ( $p = 0,019$ ). Behandelte Zellen mit Paclitaxel im Ansatz zeigten einen Trend zur Zunahme ( $p = 0,065$ ). Bei der Aussaat von 50 und 10 Zellen ließ sich im Vergleich Tag 12 zu Tag 4 keine signifikante Veränderung in der *sphere*-Anzahl feststellen. Bei allen gemessenen *spheres* kam es zur Zunahme der Durchmesser über der Zeit. (s.Tabelle 8)

SK-BR-3		500			100			50			10		
		WT	Ohne	mit	WT	ohne	mit	WT	ohne	mit	WT	ohne	mit
n	Tag 4	2,00 ± 0,93	2,25 ± 1,04	2,75 ± 0,47	2,38 ± 0,74	1,89 ± 0,35	2,25 ± 1,16	2,13 ± 0,64	1,75 ± 0,46	2,50 ± 0,93	1,75 ± 0,71	1,63 ± 0,74	1,50 ± 0,76
	Tag 12	2,00 ± 1,07	2,13 ± 1,46	3,00 ± 1,41	2,50 ± 1,31	3,13 ± 1,25	3,38 ± 1,06	2,38 ± 0,74	2,50 ± 1,07	1,88 ± 0,83	1,88 ± 0,64	1,50 ± 0,53	1,38 ± 0,52
	p < 0,05	-	-	-	-	†0,019	(†0,065)	-	-	-	-	-	-
Ø	Tag 4	352,32	340,55	301,61	157,27	208,61	174,14	122,64	164,02	131,74	71,83	78,47	96,19
	Tag 12	533,72	558,44	394,60	249,85	229,38	189,57	189,43	184,64	194,96	109,11	95,96	117,75
	%	†51%	†64%	†31%	†59%	†10%	†9%	†54%	†13%	†48%	†52%	†22%	†22%

**Tabelle 8** Vergleich der sphere Ergebnisse (Anzahl und Durchmesser) der Aussaat von 500, 100, 50 und 10 SK-BR-3 Zellen zwischen Tag 4 und Tag 12 nach Aussaat. Abkürzungen: WT = unbehandelte Kontrolle, ohne = behandelte Zellen, aber ohne Paclitaxel im Ansatz, mit = behandelte Zellen mit 1,5 ng/ml Paclitaxel im Ansatz. † beziehungsweise ‡ = Zu- beziehungsweise Abnahme zwischen Tag 4 und Tag 12,- = nicht signifikant. n beziehungsweise Ø = Anzahl beziehungsweise Durchmesser der spheres. Statistik: Anzahl der spheres Tag 4 vs. Tag 12 Signifikanz berechnet durch T-Tests, Anzahl spheres dargestellt als  $\mu \pm \sigma$ ; Durchmesser spheres deskriptiv nur Mittelwert angegeben.

### 5.4.3 JIMT-1 unter langzeitiger Paclitaxel Behandlung: *sphere*-Anzahl und -Durchmesser

#### 5.4.3.1 JIMT-1 Tag 4, *sphere*-Anzahl

Bei der Aussaat von 500 beziehungsweise 10 JIMT-1-Zellen ließ sich unter den verschiedenen Behandlungen kein Unterschied in der *sphere*-Zahl feststellen. Für die *sphere*-Anzahl bei der Aussaat von 100 Zellen pro *well* zeigte die ANOVA mit wiederholten Messungen einen Haupteffekt der Paclitaxel-Behandlung ( $F(2,14) = 7,530$ ;  $p < 0,006$ ;  $\eta^2 = 0,518$ ), der ergab, dass die Anzahl der *spheres* der behandelten Zellen ohne Paclitaxel ( $6,13 \pm 2,53$ ) und mit Paclitaxel im Ansatz ( $8,25 \pm 2,25$ ) im Vergleich zur *sphere*-Anzahl der unbehandelten Kontrolle ( $9,62 \pm 1,92$ ) abnahm. Die post-hoc gepaarten T-Tests ergaben dabei, dass sich nur die behandelten Zellen ohne Paclitaxel-Zugabe von der Wildtyp-Kontrolle signifikant unterschieden ( $t = 3,632$ ;  $p = 0,008$ ), alle anderen Bedingungen zeigten nur einen Trend (alle  $t \geq -1,945$ ;  $p \leq 0,093$ ).

Für die *sphere*-Anzahl bei der Aussaat von 50 Zellen pro *well* zeigte die ANOVA mit wiederholten Messungen einen Haupteffekt der Paclitaxel-Behandlung ( $F(2,14) = 14,096$ ;  $p < 0,000$ ;  $\eta^2 = 0,668$ ), der ergab, dass die Anzahl der *spheres* der behandelten Zellen ohne Paclitaxel ( $3,75 \pm 1,98$ ) und mit Paclitaxel im Ansatz ( $3,25 \pm 1,04$ ) im Vergleich zur *sphere*-Anzahl der unbehandelten Kontrolle ( $6,50 \pm 2,20$ ) abnahm. Die post-hoc gepaarten T-Tests ergaben dabei, dass sich behandelte Zellen mit und ohne Paclitaxel im Ansatz nicht voneinander unterschieden, alle anderen Bedingungen unterschieden sich signifikant (alle  $t \geq 4,478$ ;  $p \leq 0,003$ ).

#### 5.4.3.2 JIMT-1 Tag 12, *sphere*-Anzahl

Während bei der Aussaat von 100 beziehungsweise 10 unterschiedlich behandelte JIMT-1-Zellen pro *well* in der Anzahl gebildeter *spheres* kein merklicher Unterschied erkennbar war, gab es Veränderungen bei der Aussaat von 500 beziehungsweise 50 Zellen. Für die *sphere*-Anzahl bei der Aussaat von 500 Zellen pro *well* zeigte die ANOVA mit wiederholten Messungen einen Haupteffekt der Paclitaxel-Behandlung ( $F(2,14) = 14,835$ ;  $p < 0,000$ ;  $\eta^2 = 0,679$ ), der angab, dass die Anzahl der *spheres* der behandelten Zellen ohne ( $21,00 \pm 7,15$ ) und mit Paclitaxel im Ansatz ( $18,63 \pm 7,46$ ) im Vergleich zur Anzahl der *spheres* der unbehandelten Kontrolle ( $8,25 \pm 4,10$ ) zunahm. Die post-hoc gepaarten T-Tests ergaben dabei, dass sich bis auf die Anzahl der *spheres* von behandelten Zellen ohne

Paclitaxel-Zusatz im Vergleich zu denen mit Paclitaxel-Zusatz alle Bedingungen signifikant voneinander unterschieden (alle  $t \geq -5,004$ ;  $p \leq 0,002$ ).

Für die *sphere*-Anzahl bei der Aussaat von 50 Zellen pro *well* zeigte die ANOVA mit wiederholten Messungen einen Haupteffekt der Paclitaxel-Behandlung ( $F(2,14) = 3,560$ ;  $p < 0,056$ ;  $\eta^2 = 0,337$ ), der angab, dass die Anzahl der *spheres* der behandelten Zellen ohne ( $3,50 \pm 1,07$ ) und mit Paclitaxel im Ansatz ( $3,63 \pm 0,92$ ) im Vergleich zur *sphere*-Anzahl der unbehandelten Kontrolle ( $6,38 \pm 3,81$ ) abnahm. Die post-hoc gepaarten T-Tests ergaben dabei, dass nur die behandelten Zellen ohne Paclitaxel im Ansatz im Vergleich zum Wildtyp einen Trend zur Abnahme der *sphere*-Anzahl pro *well* zeigten ( $t = 2,106$ ;  $p = 0,073$ ).

#### **5.4.3.3 JIMT-1 Vergleich Tag 4 und Tag 12, *sphere*-Anzahl und -Durchmesser**

Es lässt sich eine signifikante Abnahme in der Anzahl der *spheres* von Tag 4 auf Tag 12 nach Aussaat von 500 unbehandelter Zellen beobachten ( $p = 0,022$ ), dabei nahm der Durchmesser zu. Es lässt sich auch bei der Aussaat von 100 unbehandelten Zellen im Vergleich Tag 12 zu Tag 4 eine signifikante Abnahme in der *sphere*-Anzahl feststellen ( $p = 0,037$ ). Bei der Aussaat von 50 und 10 Zellen ließen sich keine signifikanten Veränderungen zwischen Tag 4 und Tag 12 beobachten. (s.Tabelle 9)

JIMT-1		500			100			50			10		
		WT	Ohne	mit	WT	ohne	mit	WT	ohne	mit	WT	ohne	mit
n	Tag 4	16,00 ± 6,41	19,00 ± 3,78	20,25 ± 3,81	9,63 ± 1,92	6,13 ± 2,53	8,25 ± 2,25	6,50 ± 2,20	3,75 ± 1,98	3,25 ± 1,04	2,36 ± 1,60	2,13 ± 1,36	1,13 ± 0,99
	Tag 12	8,25 ± 4,10	21,00 ± 7,15	18,63 ± 7,46	6,50 ± 2,98	8,86 ± 3,60	7,75 ± 2,82	6,38 ± 3,81	3,50 ± 1,07	3,63 ± 0,92	2,25 ± 1,04	2,00 ± 0,93	1,38 ± 1,30
	P < 0,05	↓0,022	-	-	↓0,037	-	-	-	-	-	-	-	-
Ø	Tag 4	136,81	112,99	103,58	96,32	81,53	75,32	78,09	97,41	78,23	62,60	64,14	70,86
	Tag 12	209,24	132,72	126,07	139,04	117,36	99,85	112,47	123,90	95,14	81,90	98,41	74,31
	%	↑53%	↑17%	↑22%	↑44%	↑44%	↑33%	↑44%	↑27%	↑22%	↑31%	↑53%	↑5%

**Tabelle 9** Vergleich der sphere Ergebnisse (Anzahl und Durchmesser) der Aussaat von 500, 100, 50 und 10 JIMT-1 Zellen zwischen Tag 4 und Tag 12 nach Aussaat. Abkürzungen: WT = unbehandelte Kontrolle, ohne = behandelte Zellen, aber ohne Paclitaxel im Ansatz, mit = behandelte Zellen mit 1,5 ng/ml Paclitaxel im Ansatz. ↑ beziehungsweise ↓ = Zu- beziehungsweise Abnahme zwischen Tag 4 und Tag12,- = nicht signifikant. n beziehungsweise Ø = Anzahl beziehungsweise Durchmesser der spheres. Statistik: Anzahl der spheres Tag 4 vs. Tag 12 Signifikanz berechnet durch T-Tests, Anzahl spheres dargestellt als  $\mu \pm \sigma$ ; Durchmesser spheres deskriptiv nur Mittelwert angegeben.

#### 5.4.4 BT-474 unter 48-Stunden-Paclitaxel-Behandlung: *sphere*-Anzahl und -Durchmesser

##### 5.4.4.1 BT-474 Tag 4, *sphere*-Anzahl

Außer bei der Aussaat von 50 Zellen ergaben die *Dilution*-Assays der Kurzzeit-behandelten BT-474-Zellen signifikante Unterschiede in der Zahl der *spheres*.

Für die *sphere*-Anzahl bei der Aussaat von 500 Zellen pro *well* zeigte die ANOVA mit wiederholten Messungen einen Haupteffekt der Paclitaxel-Behandlung ( $F(2,14) = 4,811$ ;  $p < 0,026$ ;  $\eta^2 = 0,407$ ), der zeigte, dass die Anzahl der *spheres* der mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen ( $5,75 \pm 3,58$ ) und mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen ( $7,88 \pm 4,45$ ) im Vergleich zur *sphere*-Anzahl der unbehandelten Kontrolle ( $2,88 \pm 1,55$ ) zunahm. Die post-hoc gepaarten T-Tests zeigten, dass bis auf die Anzahl der *spheres* der Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen alle anderen Bedingungen einen Unterschied aufwiesen: die Anzahl der *spheres* unbehandelter Zellen im Vergleich zu mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen unterschied sich signifikant ( $t = -2,457$ ;  $p = 0,044$ ), die Anzahl der *spheres* mit 0,5 beziehungsweise mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen wies einen Trend zur Zunahme bei steigender Paclitaxel-Konzentration auf ( $t = -1,974$ ;  $p = 0,089$ ).

Für die *sphere*-Anzahl bei der Aussaat von 100 Zellen pro *well* zeigte die ANOVA mit wiederholten Messungen einen Haupteffekt der Paclitaxel-Behandlung ( $F(2,14) = 9,892$ ;  $p < 0,002$ ;  $\eta^2 = 0,586$ ), der zeigte, dass die Anzahl der *spheres* der mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen ( $6,13 \pm 2,36$ ) und mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen ( $7,13 \pm 3,44$ ) im Vergleich zur *sphere*-Anzahl der unbehandelten Kontrolle ( $2,38 \pm 0,52$ ) zunahm. Die post-hoc gepaarten T-Tests zeigten, dass sich bis auf die Anzahl der *spheres* der mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen verglichen mit jener der mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen alle Bedingungen signifikant voneinander unterschieden (alle  $t \geq -5,167$ ;  $p \leq 0,006$ ).

Für die *sphere*-Anzahl bei der Aussaat von 10 Zellen pro *well* zeigte die ANOVA mit wiederholten Messungen einen Haupteffekt der Paclitaxel-Behandlung ( $F(2,14) = 13,087$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,652$ ), der zeigte, dass die Anzahl der *spheres* der mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen ( $1,75 \pm 0,71$ ) und mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen ( $2,00 \pm 0,93$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $0,25 \pm 0,71$ ) zunahm. Die post-hoc gepaarten T-Tests zeigten, dass sich bis auf die Anzahl der *spheres* der mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen verglichen mit jener der mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen alle Bedingungen signifikant voneinander unterschieden (alle  $t \geq -4,583$ ;  $p \leq 0,009$ ).



#### 5.4.4.2 BT-474 Tag 12, *sphere*-Anzahl

Während sich kein Unterschied in der Anzahl gebildeter *spheres* bei der Aussaat von 50 beziehungsweise 10 Zellen zeigte, gab es Signifikanzen bei der Aussaat von 500 beziehungsweise 100 Zellen. Für die *sphere*-Anzahl bei der Aussaat von 500 Zellen pro *well* zeigte die ANOVA mit wiederholten Messungen einen Haupteffekt der Paclitaxel-Behandlung ( $F(2,14) = 3,965$ ;  $p < 0,043$ ;  $\eta^2 = 0,362$ ), der zeigte, dass die Anzahl der *spheres* der mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen ( $2,13 \pm 0,99$ ) und mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen ( $2,13 \pm 1,13$ ) im Vergleich zur Anzahl der *spheres* der unbehandelten Kontrolle ( $1,00 \pm 0,00$ ) zunahm. Die post-hoc gepaarten T-Tests zeigten, dass sich bis auf die Anzahl der *spheres* der mit 0,5 M Paclitaxel behandelten Zellen verglichen mit jener der mit 1,0 M Paclitaxel behandelten Zellen alle Bedingungen signifikant voneinander unterschieden (alle  $t \geq -3,211$ ;  $p \leq 0,026$ ).

Für die *sphere*-Anzahl bei der Aussaat von 100 Zellen pro *well* zeigte die ANOVA mit wiederholten Messungen einen Haupteffekt der Paclitaxel-Behandlung ( $F(2,14) = 10,188$ ;  $p < 0,002$ ;  $\eta^2 = 0,593$ ), der zeigte, dass die Anzahl der *spheres* der mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen ( $2,13 \pm 0,83$ ) und mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen ( $3,00 \pm 0,76$ ) im Vergleich zur Anzahl der *spheres* der unbehandelten Kontrolle ( $1,25 \pm 0,46$ ) zunahm. Die post-hoc gepaarten T-Tests zeigten, dass sich bis auf die Anzahl der *spheres* der mit 0,5 M Paclitaxel behandelten Zellen verglichen mit jener der mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen alle Bedingungen voneinander unterschieden: mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelte Zellen verglichen mit dem Wildtyp zeigten einen Trend zur Zunahme der *sphere*-Anzahl ( $t = -2,198$ ;  $p = 0,064$ ) und mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelte Zellen bildeten signifikant mehr *spheres* als der Wildtyp ( $t = -7,000$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 5.4.4.3 BT-474 Vergleich Tag 4 und Tag 12, *sphere*-Anzahl und -Durchmesser

Zwischen Tag 4 und Tag 12 kam es sowohl bei unbehandelten Zellen ( $p = 0,002$ ) als auch bei mit 0,5 ( $p = 0,012$ ) beziehungsweise 1,0  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,008$ ) Paclitaxel behandelten Zellen zu einer (sehr) signifikanten Abnahme der *sphere*-Anzahl, gleichzeitig nahm der durchschnittliche Durchmesser der *spheres* zu. Auch bei der Aussaat von 100 Zellen ließ sich durchweg eine sehr signifikante Abnahme in der *sphere*-Zahl verzeichnen, wobei sich der durchschnittliche Durchmesser gegenläufig verhielt. Bei der Aussaat von 50 Zellen konnte an Tag 12 durchweg ein größerer Durchmesser der *spheres* verzeichnet werden. Dabei nahm die *sphere*-Zahl der mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen signifikant ab ( $p = 0,024$ ), während

die der mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen zunahm ( $p = 0,014$ ). An Tag 12 konnten bei den unbehandelten Zellen und bei den mit 1,0  $\mu\text{M}$  Paclitaxel behandelten Zellen signifikant mehr *spheres* gezählt werden ( $p = 0,020$ ). Dabei nahmen die Durchmesser dieser zu. Bei mit 0,5  $\mu\text{M}$  behandelten Zellen kam es zur Abnahme in der *sphere*-Zahl ( $p = 0,049$ ), wobei der Durchmesser der *spheres* zunahm. (s. Tabelle 10)

BT-474 KZ		500			100			50			10		
		WT	0,5 PTX	1,0 PTX	WT	0,5 PTX	1,0 PTX	WT	0,5 PTX	1,0 PTX	WT	0,5 PTX	1,0 PTX
n	Tag 4	2,88 ± 1,55	5,75 ± 3,58	7,88 ± 4,45	2,38 ± 0,52	6,13 ± 2,36	7,13 ± 3,44	2,25 ± 1,75	3,50 ± 1,41	2,88 ± 1,36	0,25 ± 0,71	1,75 ± 0,71	2,00 ± 0,93
	Tag 12	1,00 ± 0,00	2,13 ± 0,99	2,13 ± 1,13	1,25 ± 0,46	2,13 ± 0,83	3,00 ± 0,76	1,38 ± 0,52	1,88 ± 0,83	1,50 ± 1,07	1,13 ± 0,64	1,13 ± 0,35	1,25 ± 0,46
	p < 0,05	↓0,002	↓0,012	↓0,008	↓0,002	↓0,001	↓0,005	-	↓0,024	↓0,014	↑0,006	↓0,049	↓0,020
Ø	Tag 4	120,08	103,78	98,04	87,75	77,36	74,28	74,38	84,05	80,77	40,13	65,87	60,82
	Tag 12	288,67	219,95	179,20	161,17	136,74	116,27	112,52	121,71	126,85	68,28	93,94	86,41
	%	↑140%	↑112%	↑83%	↑84%	↑77%	↑57%	↑51%	↑45%	↑57%	↑70%	↑43%	↑42%

**Tabelle 10** Vergleich der sphere Ergebnisse (Anzahl und Durchmesser) der Aussaat von 500, 100, 50 und 10 BT-474 Zellen zwischen Tag 4 und Tag 12 nach Aussaat. Abkürzungen: WT = unbehandelte Kontrolle, 0,5 beziehungsweise 1,0 PTX= mit 0,5 beziehungsweise 1,0 µM Paclitaxel über 48 Stunden behandelte Zellen, aber ohne Paclitaxel im sphere Ansatz. ↑ beziehungsweise ↓ = Zu- beziehungsweise Abnahme zwischen Tag 4 und Tag12,- = nicht signifikant. n beziehungsweise Ø = Anzahl beziehungsweise Durchmesser der spheres. Statistik: Anzahl der spheres Tag 4 vs. Tag 12 Signifikanz berechnet durch T-Tests, Anzahl spheres dargestellt als  $\mu \pm \sigma$ ; Durchmesser spheres deskriptiv nur Mittelwert angegeben.

<b>BT-474</b>	LZ PTX	Her2	CD24	CD44	EpCAM↓	CD47↓	MET↑	E-Cadherin↑	ZO-1↑	β-Catenin	Snail	Slug	Vimentin	N-Cadherin	TCF8/ZEB1	spheres↑
	KZ PTX	Her2↓	CD24	CD44	EpCAM↓	CD47↑	MET	E-Cadherin↑	ZO-1↓	β-Catenin	Snail	Slug	Vimentin	N-Cadherin	TCF8/ZEB1	spheres↑
	LZ EPI	Her2	CD24	CD44	EpCAM↓	CD47	MET	E-Cadherin↑	ZO-1↑	β-Catenin	Snail	Slug	Vimentin	N-Cadherin	TCF8/ZEB1	
	TGF-β1	Her2	CD24	CD44	EpCAM	CD47	MET	E-Cadherin↓	ZO-1↓	β-Catenin↑	Snail	Slug	Vimentin	N-Cadherin	TCF8/ZEB1	
<b>SK-BR-3</b>	LZ PTX	Her2	CD24	CD44	EpCAM	CD47	MET	E-Cadherin	ZO-1	β-Catenin	Snail	Slug	Vimentin	N-Cadherin	TCF8/ZEB1	spheres
	LZ EPI	Her2	CD24	CD44	EpCAM	CD47	MET↓	E-Cadherin	ZO-1	β-Catenin	Snail	Slug	Vimentin	N-Cadherin	TCF8/ZEB1	
	TGF-β1	Her2	CD24	CD44	EpCAM	CD47	MET↑	E-Cadherin	ZO-1↑	β-Catenin↑	Snail	Slug	Vimentin	N-Cadherin	TCF8/ZEB1	
	LZ PTX	Her2	CD24	CD44	EpCAM	CD47	MET↓	E-Cadherin↓	ZO-1	β-Catenin↑	Snail	Slug	Vimentin	N-Cadherin	TCF8/ZEB1	spheres↓
<b>JMT-1</b>	LZ EPI	Her2	CD24	CD44↑	EpCAM	CD47	MET	E-Cadherin↓	ZO-1	β-Catenin↑	Snail	Slug	Vimentin	N-Cadherin	TCF8/ZEB1	
	TGF-β1	Her2	CD24↓	CD44	EpCAM	CD47	MET	E-Cadherin↑	ZO-1↓	β-Catenin↑	Snail	Slug↑	Vimentin	N-Cadherin	TCF8/ZEB1	

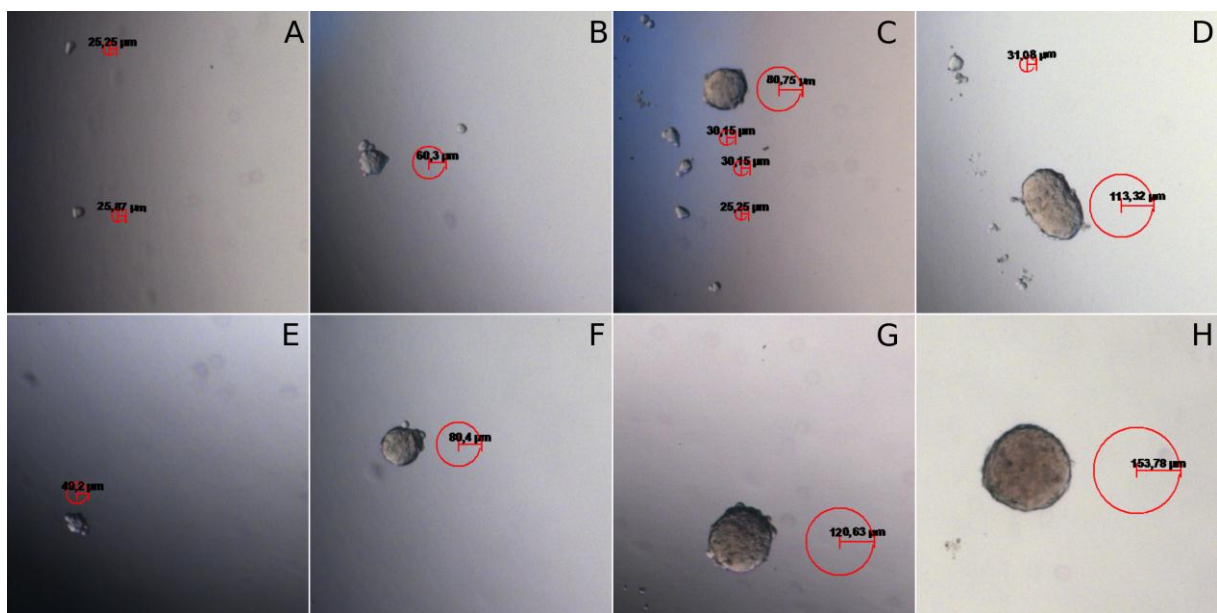
**Tabelle 11** Markerprofile aller gemessenen Zellen. LZ beziehungsweise KZ = langfristig beziehungsweise kurzzeitig behandelt; PTX = Paclitaxel, EPI = Epirubicin; ↑ beziehungsweise ↓ = Zu- beziehungsweise Abnahme der Eigenschaften im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Blau = ersichtliche Tendenzen innerhalb einer Zelllinie.

### 5.4.5 Aussehen der *mammospheres*

Generell lässt sich sagen, dass der Durchmesser der *spheres* mit der gesäten Zellzahl pro *well* korreliert, was folgende Bilder zeigen. Außerdem nahm die *sphere*-Größe zwischen Tag 4 und Tag 12 zu, während in den meisten Fällen die *sphere*-Anzahl dabei abnahm.

#### 5.4.5.1 Aussehen BT-474-*spheres*

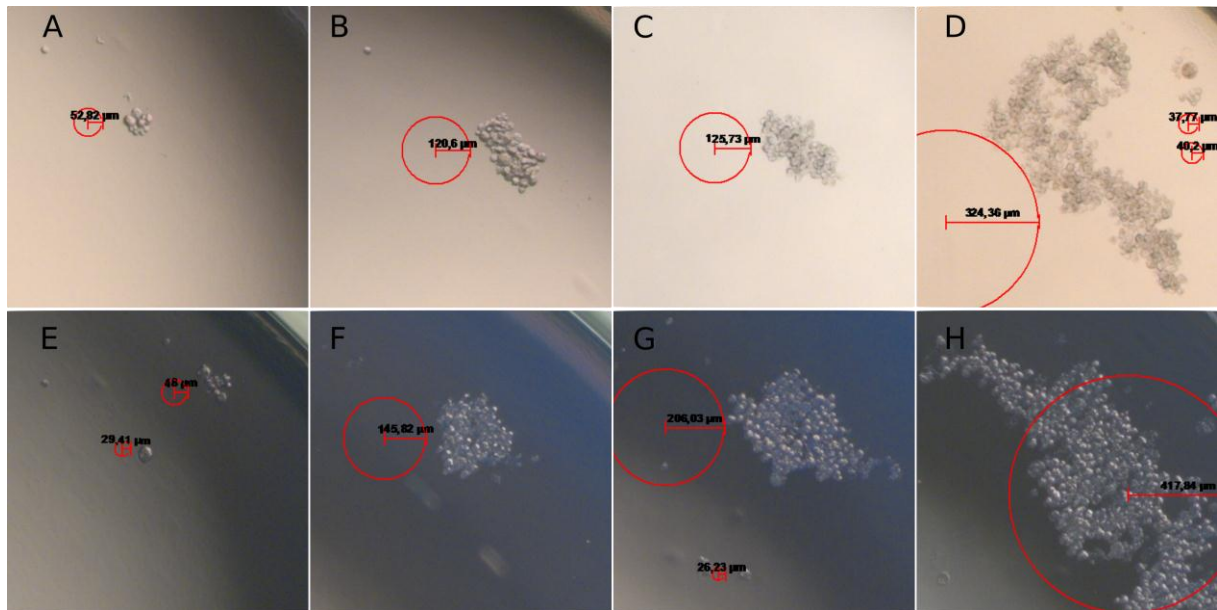
BT-474 Zellen neigen zur Bildung großer homogener kugelförmiger *spheres*, an deren Oberfläche sich kaum Einzelzellen abgrenzen lassen. Die *spheres* sahen bei allen untersuchten Gruppen (unbehandelt, behandelt) gleich aus.



**Abbildung 28** BT-474 *mammospheres* an Tag 4 und Tag 12 nach Aussaat mit 10, 50, 100 und 500 ausgesäten Zellen. Beispielhaft sind nur behandelte Zellen mit 1,5 ng/ml Paclitaxel im Ansatz dargestellt. A-D zeigen Tag 4; E-H zeigen Tag 12; A & E = Aussaat 10 Zellen; B & F = Aussaat 50 Zellen; C & G = Aussaat 100 Zellen; D & H = Aussaat 500 Zellen; roter Kreis mit Beschriftung = gemessener Radius, *sphere* definitionsgemäß Radius  $\geq 25 \mu\text{m}$ ;

#### 5.4.5.2 Aussehen SK-BR-3-*spheres*

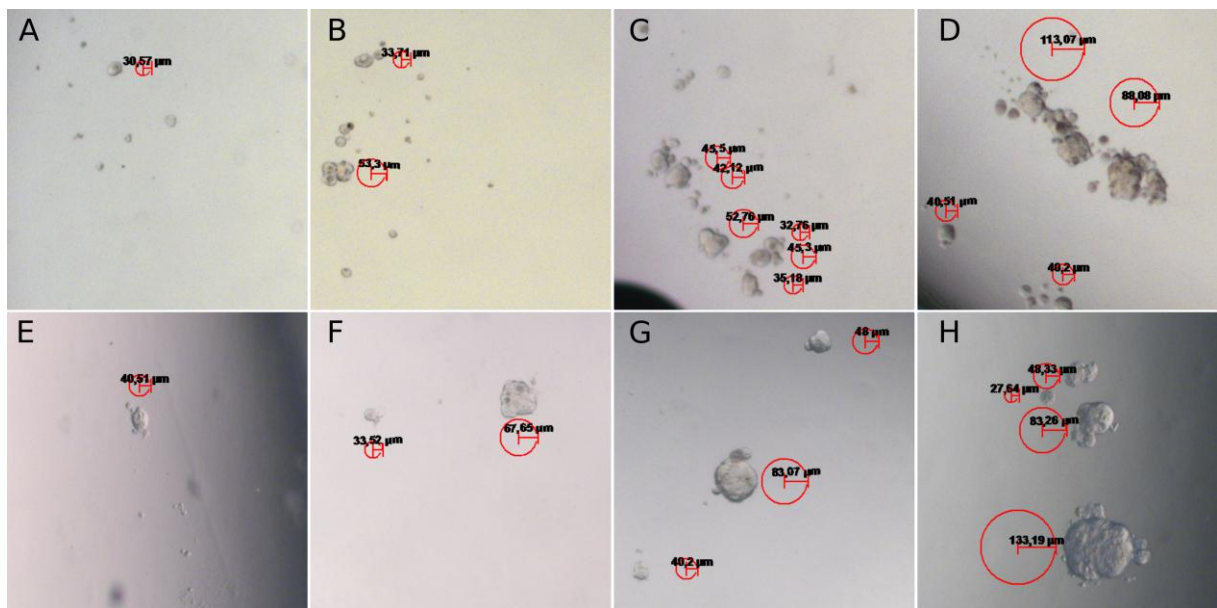
SK-BR-3 Zellen bilden weniger homogene *spheres*. Einzelzellen lassen sich deutlich an der Oberfläche abgrenzen. Die Zell-Gebilde wirken weniger stabil. Dabei ließen sich wie bei den BT-474 Zellen keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen feststellen.



**Abbildung 29** SK-BR-3 *mammospheres* an Tag 4 und Tag 12 nach Aussaat mit 10, 50, 100 und 500 ausgesäten Zellen. Beispielhaft sind nur behandelte Zellen mit 1,5 ng/ml Paclitaxel im Ansatz. A-D zeigen Tag 4; E-H zeigen Tag 12; A & E = Aussaat 10 Zellen; B & F = Aussaat 50 Zellen; C & G = Aussaat 100 Zellen; D & H = Aussaat 500 Zellen; roter Kreis mit Beschriftung = gemessener Radius, *sphere* definitionsgemäß Radius  $\geq 25$   $\mu\text{m}$ ;

#### 5.4.5.3 Aussehen JIMT-1-*spheres*

Wie BT-474 Zellen bilden JIMT-1 Zellen homogenere *spheres* als SK-BR-3 Zellen. Gleichzeitig bilden sie wie BT-474 Zellen kugelförmige Strukturen. Allerdings sind diese kleiner als bei BT-474 Zellen. Außerdem lassen sich an der Oberfläche einige Einzelzellen abgrenzen. Das Aussehen der *spheres* war bei allen untersuchten Gruppen gleich.



**Abbildung 30** JIMT-1 *mammospheres* an Tag 4 und Tag 12 nach Aussaat mit 10, 50, 100 und 500 ausgesäten Zellen. Beispielhaft sind nur behandelte Zellen mit 1,0 ng/ml Paclitaxel im Ansatz. A-D zeigen Tag 4; E-H zeigen Tag 12; A & E = Aussaat 10 Zellen; B & F = Aussaat 50 Zellen; C & G = Aussaat 100 Zellen; D & H =

Aussaat 500 Zellen; roter Kreis mit Beschriftung = gemessener Radius, *sphere* definitionsgemäß Radius  $\geq 25$   $\mu\text{m}$ ;

## 6 Diskussion

Es wurden etablierte Brustkrebszelllinien *in vitro* zytotoxisch behandelt. Anschließend wurde untersucht, ob die behandelten Zellen im Sinne Epithelial-Mesenchymaler Transition Veränderungen zeigten und vermehrt Stammzeleigenschaften aufwiesen. Auffällig war, dass die Zellen im Laufe des Behandlungszeitraums nahezu durchweg toleranter gegenüber den zytotoxischen Substanzen wurden. Dies zeigten die Verdopplungszeiten der Zellen, welche im Verlauf fast keine Unterschiede mehr zu denen der Kontrollen aufwiesen. Es konnte in der Literatur bereits gezeigt werden, dass durch zytotoxische Behandlung von Brustkrebszellen vermehrt EMT- beziehungsweise Stammzellmarker nachweisbar sind.<sup>46</sup> Ferner sind Stammzellen generell toleranter gegenüber Zytostatika: Zum einen weil sie ein langsames Wachstum aufweisen und damit für zytostatische Substanzen, die hauptsächlich sich teilende Zellen angreifen, nicht zugänglich sind und zum anderen, weil sie durch die vermehrte Expression von sogenannten ABC-Transportern einen erhöhten Efflux von Medikamenten generieren und damit deren Wirkung am Zielort verhindern.<sup>6,24</sup> Es wurde folgende Hypothese aufgestellt: **Durch die Induktion von Zytostatika-Resistenz in den Zellen sind durch den EMT Prozess Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften und vermehrt Krebsstammzellen entstanden.** Man vermutet funktionelle Zusammenhänge zwischen diesen beiden Phänomenen. Die resistenten Zellen wurden in der Folge auf mehrfach in der Literatur beschriebene EMT- und Stammzell-Biomarker untersucht.<sup>68,69</sup>

### 6.1 Oberflächenmoleküle als Biomarker für EMT und Stammzeleigenschaften

Al Hajj et al. identifizierten  $\text{CD44}^+/\text{CD24}^{\text{low}}$  im Mausmodell als tumorigene Subpopulation in Brustkrebstumoren.<sup>9</sup> Allerdings zeigten Grimshaw et al., dass der Prozentsatz von in *spheres* angereicherten  $\text{CD44}^+/\text{CD24}^{\text{low}}$  Zellen weder mit einer verstärkten *sphere* Bildungskapazität noch mit einer verstärkten Tumorigenität *in vivo* korrelierte. Dabei untersuchte die Gruppe mehrere Brustkrebszelllinien in 3D-Kultur auf *sphere* Bildung und implantierte diese Zellen anschließend in immundefiziente Mäuse. Sie entdeckten, dass die tumorigenen Zellen vermehrt *sphere* Bildungskapazität aufwiesen und gleichzeitig weder CD24 noch CD44 auf ihrer Oberfläche aufwiesen.<sup>70</sup> Vielmehr wurden Hinweise dafür gefunden, dass zur sicheren Identifikation von Tumor-initiiierenden Zellen weitere Biomarker beziehungsweise der Nachweis der zugehörigen Funktionalität (z.B.

Ausbildung von *mammospheres* im *limiting dilution* Assay) nötig sind. Da Oberflächenmoleküle im Unterschied zu anderen zelleigenen Proteinen vergleichsweise leicht nachgewiesen werden können, wird stetig nach weiteren Oberflächenproteinen gesucht, an Hand derer die Tumorigenität von Tumorzellen gemessen werden kann. Es wurden schon einige Moleküle als charakteristische Marker für Tumor-initiiierende Zellen identifiziert.<sup>8,32</sup> In dieser Arbeit wurden neben **CD24** und **CD44** zusätzlich die Oberflächenmoleküle **Her2**, **EpCAM**, **CD47** und **c-MET** untersucht.

Magnifico et al. zeigten, dass Tumor-initiiierende Zellen in **Her2**-überexprimierenden Tumoren im Vergleich zu den restlichen Zellen vermehrt Her2 auf ihrer Oberfläche exprimierten und eine erhöhte *mammosphere*-Bildungskapazität aufwiesen. Sie erklärten dies teilweise durch eine verstärkte Notch-Signalwegaktivierung.<sup>43</sup> Bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen kam es sowohl bei den langfristig zytotoxisch als auch TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen zu keiner signifikanten Veränderung in der Expression des Her2 Rezeptors. 48-Stunden-Paclitaxel-behandelte BT-474 Zellen wiesen sogar einen Trend zur verminderten Expression von Her2 auf ihrer Oberfläche auf.

Tumorigene Zellen wurden als Krebsstammzellen mit der Oberflächenmolekülkonstellation  $CD44^+/CD24^{low}$  identifiziert.<sup>9</sup> In dieser Arbeit wurde allerdings keine veränderte Expression von **CD24** bei zytotoxisch behandelten Zellen festgestellt. Dennoch konnte bei ektooper Aktivierung von Stammzellsignalwegen durch TGF- $\beta$ 1 eine verminderte Expression von CD24 auf JIMT-1 Zellen beobachtet werden (s. 5.2.3).

Nur mit Epirubicin behandelte JIMT-1 Zellen zeigten eine Veränderung in der **CD44** Expression: es kam zur signifikanten Zunahme des Moleküls auf der Oberfläche. JIMT-1 wurde über die Zeit gegenüber Epirubicin die toleranteste Zelllinie - sie konnte mit bis zu 8,0 ng/ml behandelt werden und verzeichnete dabei eine ähnliche Verdopplungszeit wie die unbehandelte Kontrolle. Dies war bei BT-474 nur mit 4,0 ng/ml und bei SK-BR-3 nur mit 2,0 ng/ml Epirubicin möglich. Somit korreliert die hohe Resistenzneigung von JIMT-1 gegenüber Epirubicin mit der Zunahme von CD44 auf der Oberfläche der Zellen, was ein Marker für EMT und Stammzellcharakter ist.<sup>9</sup> Dennoch konnte durch ektope Signalwegsinduktion mittels TGF- $\beta$ 1 keine Zunahme von CD44 auf der Oberfläche von JIMT-1 Zellen gemessen werden. BT-474 und SK-BR-3 zeigten generell eine geringe Expression von CD44. Bei ihnen blieb die Expression von CD44 unter jedweder Behandlung unverändert. Huber et al. zeigten dies ebenso bei Resistenzinduktion mittels Topotecan in MCF-7 Zellen.<sup>68</sup>



**EpCAM** ist ein epitheliales Adhäsionsmolekül und wird im Rahmen von Epithelial-Mesenchymaler Transition auf der Oberfläche von Karzinom-Zellen herunterreguliert.<sup>31</sup> Dieses Phänomen konnte bei allen zytostatisch behandelten BT-474 Zellen beobachtet werden. Bei SK-BR-3 und JIMT-1 blieb die Expression unter Behandlung unverändert, während SK-BR-3 Zellen mit ektopter Stammzellsignalweginduktion sogar einen Anstieg von EpCAM verzeichneten. EpCAM unterliegt einer dynamischen Expression auf Karzinomzellen.<sup>27</sup> Diese hängt vom Stadium der Zellen im Metastasierungsprozess ab. Während Zellen in Primärtumor und Metastase eine hohe EpCAM Expression aufweisen, ist das Molekül auf zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen herunterreguliert. Die Zellen wurden in dieser Arbeit als adhären-wachsende Kultur inkubiert und anschließend gemessen. Somit konnte die Pathophysiologie der Metastasierung von Krebszellen nicht nachgeahmt werden. Vielleicht ist dies ein Grund, warum EpCAM auf SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen nahezu unverändert exprimiert wurde.

Es wurde eine erhöhte Expression von **CD47** auf tumorigenen CTCs beschrieben.<sup>32</sup> 48-Stunden-Paclitaxel behandelte BT-474 Zellen wiesen in der Tat eine erhöhte Expression von CD47 auf. Langzeit-Paclitaxel-behandelte BT-474 Zellen wiesen jedoch einen gegenteiligen Effekt auf, es kam zur Abnahme der CD47 Expression. Bei Epirubicin-behandelten BT-474, allen zytotoxisch behandelten SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen ließen sich keine Veränderungen messen. Dies galt auch für die ektope Induktion Stammzell-spezifischer Signalwege. Die Abnahme von CD47 bei Langzeit-Paclitaxel-behandelten BT-474 Zellen ist überraschend - es wurde entdeckt, dass das CD47 Gen auf allen humanen Krebszellen heraufreguliert ist.<sup>71</sup> Es müssten Wiederholungsversuche durchgeführt werden, um den Effekt der Abnahme von CD47 zu bestätigen.

Der Wachstumsrezeptor **c-MET** ist mit „invasivem Wachstum“ und Epithelial-Mesenchymaler Transition verbunden.<sup>39</sup> Außerdem wurde er als neuer Marker zur Identifizierung tumorigener zirkulierender Brustkrebszellen vorgestellt.<sup>32</sup> Während es bei der 48-Stunden-Paclitaxel-Behandlung keine Effekte auf die c-MET Expression gab, zeigten Langzeit-behandelte BT-474 Zellen sowohl unter Paclitaxel- als auch Epirubicin-Behandlung eine Zunahme des Rezeptors (s. Abbildung 22). Bei SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen gab es gegensätzliche Effekte: Bei Epirubicin-behandelten SK-BR-3 Zellen und bei Paclitaxel-behandelten JIMT-1 Zellen kam es zur Abnahme von c-MET auf der Zelloberfläche. Alle anderen behandelten Zellen zeigten keine Effekte auf die c-MET Expression. Diese Effekte sind nicht konsistent mit der Annahme, dass durch Resistenzentwicklung und EMT vermehrt

c-MET auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dies kann bei SK-BR-3 und JIMT-1 damit zusammenhängen, dass sie die am wenigsten toleranten Zellen gegenüber den Zytostatika waren: das gilt bei SK-BR-3 für Epirubicin und bei JIMT-1 für Paclitaxel. Diese Effekte müssten durch Wiederholungsversuche weiter überprüft werden.

Zusammenfassend konnte bei keinem der untersuchten Moleküle ein allgemeingültiger Trend festgestellt werden, der sich auf alle untersuchten Zelllinien übertragen ließe. Teilweise konnten Veränderungen in der Expression der Marker beobachtet werden, die mit den Beschreibungen in der Literatur übereinstimmten, teilweise aber auch gegensätzliche Entwicklungen und teilweise gar keine Veränderungen. Die Variablen Zelllinie, Zytostatikum und Dauer und Stärke der Behandlung (langzeitig versus kurzzeitig, niedrig-dosiert versus hoch-dosiert) haben dabei sicherlich Einfluss auf die Expression der Oberflächenmoleküle. Hirose et al. beispielsweise zeigten, dass eine *low dose* Paclitaxel Behandlung sogar EMT verhindert und nicht induziert.<sup>72</sup> In der Zusammenschau der kontroversen Ergebnisse muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass die in der Literatur vorgestellten Biomarker für EMT und Stammzeleigenschaften nicht auf sämtliche Zellen angewandt werden können, was auch Lehmann et al. zeigten.<sup>69</sup> Allein anhand der untersuchten Oberflächenmarkerprofile in dieser Arbeit war nicht eindeutig festzustellen, ob die erworbene Resistenz der Zellen gegenüber Zytostatika durch den Prozess der EMT beziehungsweise durch die Erlangung von Stammzeleigenschaften zustande kam.

## 6.2 EMT-spezifische Proteine

Die untersuchten Marker wurden mehrfach mit dem EMT-Prozess in Verbindung gebracht: **E-Cadherin** und **ZO-1** sind typische Proteine epithelialer Zellen, **Vimentin** ist ein Mesenchymzellen-spezifisches Protein. **Snail**, **Slug** und **TCF8/ZEB1** sind EMT-spezifische Transkriptionsfaktoren. **β-Catenin** ist ein Effektorprotein in EMT-spezifischen Signalwegen. **N-Cadherin** wird im Rahmen des „Cadherin-Switch“ bei E-Cadherin-Herunterregulierung heraufreguliert.<sup>17,73–76</sup>

Pomp et al. beobachteten zwischen den verschiedenen molekularen Brustkrebssubtypen (*luminal*, Her2-positiv, *triple* negativ) eine unterschiedliche Expression von **E-Cadherin**. Das Protein wurde nur in *luminal* Subtypen deutlich exprimiert und bei nachgewiesener EMT herunterreguliert.<sup>77</sup> Somit sind E-Cadherin und die Herunterregulation des Proteins vermutlich für *luminal* Subtypen am ehesten aussagekräftig. SK-BR-3, eine Her2-überexprimierende Zelllinie, weist kein E-Cadherin auf, was sowohl in dieser Arbeit (s. 5.3.1)

als auch durch Manuel Iglesias et al. gezeigt werden konnte.<sup>78</sup> JIMT-1, ebenfalls eine Her2-überexprimierende Zelllinie, bildet laut Manuel Iglesias et al. eine Ausnahme und trägt E-Cadherin. Durch ektope EMT-Signalweginduktion mittels TGF- $\beta$ 1 kam es bei BT-474 zur Abnahme von E-Cadherin in den Zellen. Allerdings verhielt es sich in den mit Paclitaxel- und Epirubicin-behandelten BT-474 Zellen gegensätzlich - sie wiesen eine erhöhte E-Cadherin Expression auf. Bei ektope EMT-Signalweginduktion kam es bei JIMT-1 zur Zunahme von E-Cadherin. Dennoch ließ sich sowohl bei Paclitaxel- als auch bei Epirubicin-behandelten JIMT-1 Zellen eine Abnahme des Proteins beobachten.

**ZO-1** wurde in mit TGF- $\beta$ 1 und kurzzeitig hochdosiert mit Paclitaxel behandelten BT-474 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vermindert nachgewiesen. Langzeitig zytotoxisch behandelte BT-474 Zellen zeigten eine Zunahme des Proteins in den Zellen. Durch TGF- $\beta$ 1 konnte in JIMT-1 Zellen ebenfalls eine Abnahme von ZO-1 beobachtet werden. Dieses Phänomen ließ sich bei allen behandelten JIMT-1 Zellen messen und bestätigen.

Bei den Proteinen **Snail** und **TCF8/ZEB1** konnten in dieser Arbeit keine Veränderungen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden. Beim Transkriptionsfaktor **Slug** ließ sich nur bei ektope EMT-Signalweginduktion mittels TGF- $\beta$ 1 von JIMT-1 Zellen eine Zunahme in der Expression des Proteins feststellen. Bei allen anderen Zellen konnte keine Veränderung in der Expression von Slug festgestellt werden.

Sowohl bei BT-474 als auch bei SK-BR-3 konnte man bei TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen eine Zunahme von  **$\beta$ -Catenin** beobachten, was der Annahme entspricht, dass es bei EMT zur Zunahme des Proteins in den Zellen kommt. Allerdings konnten bei zytotoxisch-behandelten Zellen derselben Zelllinien keine Veränderung in der Expression festgestellt werden. JIMT-1 Zellen zeigten unter TGF- $\beta$ 1 und zytotoxischer Behandlung durchweg einen Anstieg des EMT-spezifischen Effektorproteins.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich für die bestimmten Proteine unter zytotoxischer Behandlung - wie bei den Oberflächenmolekülen - kein eindeutiger Trend ersehen, den man auf alle untersuchten Zelllinien übertragen könnte. Wie bei der Messung der Oberflächenmoleküle konnten teils gegensätzliche und teils gar keine Veränderungen in der Quantität der Proteine festgestellt werden. Da die Untersuchungen je nur einmal durchgeführt wurden, müssten Wiederholungen angestrebt werden, um die Ergebnisse zu verifizieren.

### 6.3 Mammospheres zum Nachweis von Stammzellen beziehungsweise Stammzeleigenschaften

Durch *sphere*-Assays kann im *limiting dilution* Verfahren die Multipotenz von Zellen *in vitro* getestet werden. Als klonal können *spheres* nur dann bezeichnet werden, wenn sie tatsächlich einer einzigen Zelle entstammen.<sup>62</sup> Die ausgesäte Zelldichte in den *sphere*-Assays hat dabei einen wesentlichen Einfluss auf die Klonalität der *spheres*: Aggregation von Zellen und einzelnen *spheres* mindern die Aussagekraft der Assays hinsichtlich Klonalität. Dies könnte durch die Aussaat von nur einer Zelle pro *well* vermieden werden. Die *sphere*-bildende Effizienz der Zellen würde hierbei stark abnehmen, da juxtakrine und parakrine Signale von Nachbarzellen fehlen würden.<sup>62</sup> Es wurde allerdings beschrieben, dass die Klonalität der *spheres* auch bei niedriger Zelldichte im *sphere*-Ansatz gewährleistet werden kann. Dontu et al. konnten bei einer Aussaat von 1000 Zellen pro 1 ml, das heißt 1 Zelle pro 1 µl, den Nachweis für die Klonalität der gebildeten *spheres* erbringen.<sup>22</sup> Generell findet man in der Literatur eine große Spannbreite an Zelldichten, bei deren Aussaat noch von Klonalität der *spheres* im Assay ausgegangen wird (unter anderem zwischen 0,2 und 20 Zellen pro µl).<sup>79–81</sup> In dieser Arbeit wurden pro *well* (und einem Volumen von 200 µl) 500, 100, 50 beziehungsweise 10 Zellen ausgesät, was den Konzentrationen 2,5, 0,5, 0,25 beziehungsweise 0,05 Zellen pro 1 µl entspricht. Neben der Zelldichte gibt es zwei weitere Faktoren, die die Aggregation der Zellen und *spheres* in den *wells* wesentlich beeinflussen: zum einen die spontane Lokomotion der hoch dynamischen, frei-schwimmenden *spheres*<sup>82,83</sup>, zum anderen die durch den Experimentator beziehungsweise durch die Experimentatorin verursachte Bewegung der Zellkulturplatten bei der Versorgung und Begutachtung der *spheres*.<sup>79</sup> In der Folge kann die Klonalität der *spheres* nur durch die Aussaat von einer Zelle pro *well* garantiert werden.<sup>62</sup> Für die *sphere*-Assays in dieser Arbeit, die mittels dem *limiting dilution* Verfahren angesetzt wurden, bedeutet dies, dass eine Klonalität der *spheres* nur mit Bedacht angenommen werden kann, da die Möglichkeit der Zell- und *sphere*-Aggregation durch die oben genannten Faktoren gegeben ist. Pastrana et al. bemerken, dass ein *sphere*-Assay alleine zur Definition von Stammzellen nicht ausreicht und zusammen mit weiteren Markern betrachtet werden sollte. Dennoch bietet das *sphere*-Assay eine gute erste Einschätzung über funktionelle Stammzeleigenschaften von Zellen und kann relativ einfach durchgeführt werden.<sup>62</sup>

Bei den über einen längeren Zeitraum mit Paclitaxel behandelten Zellen wurde zunächst überprüft, ob ein Weglassen des Zytostatikums im *sphere*-Assay im Vergleich zur Weitergabe

von Paclitaxel im Assay Auswirkungen auf die Anzahl der *spheres* hatte. In der Tat konnten dabei nur geringe Unterschiede festgestellt werden. Der Assay behandelter BT-474 Zellen zeigte bei der Aussaat von 10 Zellen pro *well* am ersten Messtag unter Fortsetzung der Paclitaxel-Behandlung mehr *spheres* als in Abwesenheit der Behandlung. Bei allen anderen *sphere*-Ansätzen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen, sodass man davon ausgehen kann, dass weder das Weglassen noch die Weiterführung der Paclitaxel-Behandlung Auswirkungen auf die Anzahl der *spheres* Paclitaxel-behandelter Zellen hat. Demnach könnte man in weiteren *sphere*-Assays also auf die Zugabe von Paclitaxel im Medium verzichten.

**Langzeitig** mit Paclitaxel behandelte **BT-474** Zellen zeigten am ersten Messtag nur bei einer Aussaat von 10 Zellen mehr *spheres* als die unbehandelte Kontrolle. Am zweiten Messtag konnte man nur bei der Aussaat von 500 langfristig behandelter BT-474 Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine vermehrte Anzahl von *spheres* beobachten. Über **48 Stunden mit einer hohen Dosis Paclitaxel behandelte BT-474** Zellen zeigten an beiden Messtagen eine höhere Anzahl an *spheres* als die unbehandelte Kontrolle: Am ersten Messtag konnte bei einer Zellaussaat von 500, 100 und 10 Zellen pro *well* mehr *spheres* im Vergleich zur Kontrolle gezählt werden, am zweiten Messtag bei einer Aussaat von 500 und 100 pro *well*. Bei 48-Stunden-Paclitaxel-behandelten BT-474 Zellen korreliert die Anzahl der *spheres* somit vermeintlich mit einer gesteigerten Klonalität und ist möglicherweise ein Hinweis auf gewonnene Stammzeleigenschaften. Sowohl bei behandelten als auch unbehandelten BT-474 Zellen beobachtete man allerdings zwischen den beiden Messtagen (Tag 4 und Tag 12 nach Ansatz der Assays) größtenteils eine Abnahme der *sphere*-Anzahl. Gleichzeitig nahm aber der durchschnittliche Durchmesser der *spheres* stark zu: je nach Zellaussaat und Behandlung um bis zu 141 %. Diese Beobachtungen gelten sowohl für langfristig behandelte als auch für 48-Stunden-behandelte Zellen. Dies lässt sich möglicherweise durch die generell hohe Tendenz der BT-474 Zellen zur Bildung von *spheres* erklären. BT-474 wurde als langzeit-*sphere*-bildende Zelllinie beschrieben, die über mehrere Passagen (durch mechanische Prozessierung von *spheres* und Wiederaussaat von Einzelzellen im *sphere*-Assay) in der Lage ist, *spheres* zu bilden.<sup>78</sup> Wie in 5.4.5 beschrieben bildeten BT-474 *spheres* homogene und große *spheres*. Wahrscheinlich sind frei-schwimmende BT-474 *spheres* sehr dynamisch und können sich durch Lokomotion und passive Bewegung (durch den Experimentator oder die Experimentatorin) zu größeren *spheres* verbinden. Dies würde die Abnahme der *sphere*-Anzahl bei gleichzeitiger starker Zunahme der *sphere*-Durchmesser über die Zeit erklären. Man kann bei den in dieser Arbeit angesetzten BT-474 *spheres* also nur unter Vorbehalt von Klonalität ausgehen, da es möglicherweise zur Aggregation der *spheres* untereinander

gekommen ist. Festzuhalten ist dennoch, dass langfristig und kurzzeitig behandelte BT-474 Zellen an den jeweiligen Messtagen teils mehr *spheres* pro *well* aufwiesen als die jeweilige unbehandelte Kontrolle.

Bei **SK-BR-3** Zellen konnte man an beiden Messtagen keine Zu- oder Abnahme der *sphere*-Anzahl der behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beobachten. Die *sphere*-Anzahl der gesäten **SK-BR-3** Zellen blieb auch zwischen den beiden Messtagen weitestgehend konstant. Allerdings kam es bei der Aussaat von 100 Zellen zu einer Zunahme der *sphere*-Anzahl der behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zwischen Tag 4 und Tag 12 bei nur geringer Zunahme der Durchmesser der *spheres* um 9 beziehungsweise 10 % zu. Eine Aggregation der *spheres* zu größeren *spheres* über die Zeit kann hier demzufolge weitestgehend ausgeschlossen werden. SK-BR-3 Zellen wurden allerdings auf Grund des Aussehens ihrer *spheres* (s. 5.4.5) als nicht-*sphere*-bildende Zellen beschrieben. Durch die Inhomogenität und klare Abgrenzung einzelner Zellen in den 3D-Gebilden wurden sie als „Zellklumpen“ und weniger als *spheres* beschrieben. Als Begründung für die Unfähigkeit von SK-BR-3, *spheres* zu bilden, wurde die Abwesenheit von dem epithelialen Protein E-Cadherin vermutet.<sup>78</sup> Das Fehlen von E-Cadherin in SK-BR-3 Zellen konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden (s. 5.3.1). Durch Re-Expression von E-Cadherin in SK-BR-3 Zellen konnte eine *sphere*-bildende Kapazität der Zellen erreicht werden, weswegen Manuel Iglesias et al. postulierten, dass sich *sphere* Assays vor allem für E-Cadherin positive Zelllinien eignen<sup>78</sup>. In dieser Arbeit konnten zwischen behandelten und unbehandelten *spheres* kein Unterschied im Aussehen erkannt werden, sodass man nicht von einem *de novo* Gewinn *sphere*-bildender Kapazität ausgehen kann. Es ist also fraglich, ob es sich bei den 3D-Gebilden in den SK-BR-3 *sphere* Assays um Zellaggregate oder tatsächlich um *spheres* handelt.

Behandelte **JIMT-1** Zellen bildeten am ersten Messtag bei einer Aussaat von 100 und 50 Zellen sogar weniger *spheres* als die unbehandelten Kontrollzellen. Am zweiten Messtag bildeten die behandelten JIMT-1 Zellen bei der Aussaat von 500 Zellen mehr und bei der Aussaat von 50 Zellen weniger *spheres* als die unbehandelten Zellen. **JIMT-1** *spheres* zeigten über die Zeit fast keine Veränderung in der Anzahl der *spheres*. Tendenziell kam es auch hier zur Abnahme in der Anzahl (Aussaat von 500 beziehungsweise 100 Zellen pro *well* der unbehandelten Zellen) bei gleichzeitiger Zunahme des Durchmessers von 44 beziehungsweise 53 %. Dabei wurde JIMT-1 Zellen wie BT-474 Zellen generell die Fähigkeit zugeschrieben, *spheres* über mehrere Passagen hinweg zu bilden.<sup>78</sup> Wie BT-474 bilden JIMT-1 Zellen

homogene 3D-Gebilde. Im Gegensatz zu BT-474 kam es nicht zur signifikanten Abnahme der *sphere* Anzahl und zu einer weniger starken Zunahme der *sphere*-Durchmesser (bis 53%) während der Messperiode. JIMT-1 *spheres* sind vermutlich weniger dynamisch. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass JIMT-1 *spheres* in dieser Arbeit klonal und ein tatsächlicher *readout* Parameter für Stammzeleigenschaften sind. Teilweise zeigten behandelte JIMT-1 Zellen allerdings weniger *spheres* pro well als die behandelte Kontrolle an den jeweiligen Messtagen.

Zusammenfassend kann man keine Aussage über die Klonalität der gebildeten *spheres* der behandelten BT-474 und JIMT-1 Zellen treffen, da man aufgrund der Abnahme in der Anzahl und Zunahme der Durchmesser über die Zeit nicht sicher sein kann, dass es sich nicht um Aggregate mehrerer *spheres* handelt. Allerdings kann man beurteilen, ob die behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an den jeweiligen Messtagen mehr oder weniger *spheres* aufwiesen und somit Aussagen über die *sphere* Bildungskapazität treffen.

#### **6.4 Diskussion aller Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt Stammzeleigenschaften und EMT**

Zur Detektion von Stammzeleigenschaften und EMT bedarf es der gleichzeitigen Untersuchung mehrerer Marker, da diese jeweils für sich betrachtet in Ihrer Aussagekraft an Grenzen stoßen. Beispielsweise wurden CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> Zellen von Al-Hajj et al. *in vivo* als tumorogene Subpopulation in Brustkrebstumoren identifiziert.<sup>9</sup> Demgegenüber zeigten Grimshaw et al., dass diese Markerkonstellation nicht unbedingt mit Tumorigenität korreliert. Diese Gruppe entdeckte bei der Untersuchung mehrerer Brustkrebszelllinien, dass die tumorigenen Zellen im Mausmodell weder CD24 noch CD44 auf der Zelloberfläche trugen.<sup>70</sup> Das Adhäsionsmolekül E-Cadherin eignet sich offensichtlich auch nicht bei jeder Zelllinie als Marker für EMT und Stammzeleigenschaften, da es unter anderem bei SK-BR-3 nicht exprimiert wird und somit auch nicht (im Rahmen einer EMT) weiter herunterreguliert werden kann.<sup>78</sup> Darüber hinaus ist die Klonalität, die in *sphere*-Assays gemessen werden kann, nicht zwangsläufig eine Eigenschaft von Tumorstammzellen, sondern eine Qualität, die auch auf Progenitorzellen zutrifft.<sup>62</sup> Dabei wäre es wünschenswert und wichtig, Stammzeleigenschaften und EMT verlässlich identifizieren zu können. Nur so kann man nachvollziehen, ob beispielsweise durch zytotoxische Behandlung tatsächlich EMT und Stammzeleigenschaften in Zellen induziert werden. In dieser Arbeit wurden deswegen verschiedene in der Literatur beschriebene Marker, die Stammzeleigenschaften und EMT

nachweisen sollen, durchflusszytometrisch, proteinbiochemisch und in 3D-Zellkultur untersucht. Es sollte gemessen werden, ob die durch Zytostatika Behandlung erlangte Resistenz der Zellen gegenüber jener tatsächlich zu einem Gewinn von mesenchymalem Charakter (durch EMT) und Stammzeleigenschaften geführt hat. Dass die untersuchten Zellen tatsächlich resistent gegenüber den Zytostatika geworden sind, zeigen die Verdopplungszeiten der Zellen, welche sich gegenüber denen der Kontrolle nahezu nicht unterscheiden.

Die Fragestellung der Arbeit, ob durch zytostatische Behandlung und Resistenzinduktion vermehrt EMT entsteht und dadurch vermehrt Stammzeleigenschaften in den Zellen vorhanden sind, kann anhand der in der Literatur postulierten Marker, die in dieser Arbeit gemessen wurden, nicht ohne Weiteres beantwortet werden. Die verschiedenen resistenten Mammakarzinomzellen weisen nämlich unterschiedlichste Markerprofile auf. Dabei scheinen die Variablen Zelllinien Subtyp (Brustkrebs Subentität), Dauer, Art und Dosis der Behandlung wesentlichen Einfluss auf die gemessenen Moleküle und funktionellen Eigenschaften zu haben. Es stellen sich also neben der Frage, ob vermehrt mesenchymaler Charakter und Stammzeleigenschaften in den Zellen entstanden sind, zwei weitere Fragen, nämlich ob die in der Literatur beschriebenen Marker EMT und Stammzeleigenschaften überhaupt nachweisen und ob die Marker auf alle Zelllinien gleichermaßen anwendbar sind.

Bei allen zytostatisch behandelten **BT-474** Zellen wurde im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme von **EpCAM** auf der Oberfläche gemessen. Dies ist vereinbar mit der Annahme, dass Zellen mesenchymalen Charakters (erlangt durch EMT) weniger EpCAM exprimieren. In den behandelten BT-474 Zellen kam es allerdings gleichzeitig zu einer Zunahme von **E-Cadherin** im Vergleich zur Kontrolle. Diese Entwicklung wiederum ist der Annahme entgegengesetzt, dass es durch zunehmenden mesenchymalen Charakter der Zellen ebenfalls zur Abnahme dieses Moleküls kommt. Langzeitig und kurzzeitig mit Paclitaxel behandelte BT-474 Zellen bildeten teilweise an jeweils beiden Messtagen mehr *spheres* als die Kontrolle und wiesen somit eine höhere *sphere* Bildungskapazität auf als die unbehandelten Kontrollzellen. Da die Durchmesser der *spheres* während der Messperiode stark zunahmen, kann die Klonalität der *spheres* nur mit Bedacht angenommen werden, da eventuell mehrere *spheres* untereinander Aggregate gebildet haben. Andere Marker wie Her2, CD47, MET, ZO-1 und  $\beta$ -Catenin zeigten bei resistenten Zellen im Vergleich zur Kontrolle je nach Art der Behandlung unterschiedliche Tendenzen, sodass deren Aussagekraft bei resistenten BT-474 Zellen fraglich ist. Vorausgesetzt die resistenten Zellen in dieser Arbeit besäßen einen



mesenchymalen Charakter und hätten mehr Stammzeleigenschaften als die Kontrolle, dann wären - abgeleitet von den Ergebnissen - EpCAM als Oberflächenmarker und das *sphere*-Assay als funktioneller Marker tatsächlich gute Möglichkeiten EMT und Stammzeleigenschaften in BT-474 Zellen nachzuweisen. Warum allerdings E-Cadherin in den resistenten Zellen zunimmt, müsste weiter untersucht beziehungsweise in weiteren Versuchen bestätigt werden. Manuel Iglesias et al. argumentierten, dass E-Cadherin exprimierende Zellen vermehrt in der Lage sind, *spheres* zu bilden.<sup>78</sup> Vielleicht stehen die Zunahme von E-Cadherin und die Zunahme der *sphere* Bildungskapazität in dieser Weise im Zusammenhang.

In zytostatisch behandelten **SK-BR-3** Zellen ließ sich für keinen der Marker ein Trend feststellen. Während die meisten gemessenen Marker keine Unterschiede zur Kontrolle aufzeigten, wiesen c-MET und  $\beta$ -Catenin unterschiedliche Entwicklungen auf. Entweder die resistenten SK-BR-3 Zellen haben keinen mesenchymalen Charakter und haben nicht mehr Stammzeleigenschaften als die Kontrolle erlangt, oder die gemessenen Marker eignen sich nicht für die Zelllinie SK-BR-3. Letzteres gilt sicherlich für E-Cadherin und die Erwartung, dass das Molekül in Zellen, die vermehrt EMT durchlaufen, abnimmt - E-Cadherin ist in SK-BR-3 Zellen nämlich nicht nachweisbar.

Bei behandelten **JIMT-1** Zellen fiel auf, dass sie die höchsten Konzentrationen des Zytostatikums Epirubicin tolerierten. An der Oberfläche der Epirubicin behandelten Zellen waren erhöhte **CD44** Level im Vergleich zur Kontrolle messbar. Gleichzeitig wurden eine Abnahme von **E-Cadherin** und eine Zunahme von  **$\beta$ -Catenin** in den Zellen gemessen. Alle drei Moleküle werden in der Literatur als Biomarker für mesenchymalen Charakter (gewonnen durch EMT) und für Stammzeleigenschaften von Zellen diskutiert. Somit wäre es möglich, dass sich JIMT-1 als Zelllinie eignet, um anhand der genannten Marker vermehrt EMT und Stammzeleigenschaften festzustellen - vorausgesetzt die Epirubicin-resistenten Zellen haben tatsächlich vermehrt mesenchymalen und Stammzell-ähnlichen Charakter. Alle weiteren Oberflächenmoleküle und Proteine, die in den behandelten Zellen gemessen wurden, zeigten keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle. Es wurde für diese Zellen kein *sphere* Assay angesetzt. Dies müsste erfolgen, um weiter beurteilen zu können, ob die Zellen zusätzlich mehr *sphere* Bildungskapazität aufweisen als die Kontrolle. Mit Paclitaxel behandelte JIMT-1 Zellen waren gegenüber dem Zytostatikum verglichen mit BT-474 und SK-BR-3 die am wenigsten tolerante Zelllinie. Trotzdem zeigten sie wie mit Epirubicin behandelte JIMT-1 Zellen eine Abnahme von E-Cadherin und eine Zunahme von  $\beta$ -Catenin.

Allerdings wiesen sie im *sphere* Assay teilweise eine geringere *sphere* Bildungskapazität auf als die Kontrolle und es kam zu einer Abnahme von c-MET auf der Oberfläche der Zellen. In der Zusammenschau der kontroversen Ergebnisse muss in Frage gestellt werden, ob Paclitaxel behandelte JIMT-1 Zellen erstens überhaupt resistent gegenüber Paclitaxel waren und ob zweitens vermehrt EMT und Stammzeleigenschaften entstanden sind.

Es hat den Anschein, dass gängige EMT- und Stammzell-Marker nicht uneingeschränkt zur Untersuchung der in dieser Arbeit behandelten Zellen geeignet sind. Huber et al. beispielsweise beobachteten im Rahmen Topotecan-induzierter, vermehrter Expression von ABCG2, einem ABC-Transporter, auf MCF-7 Brustkrebszellen eine Abnahme der Tumorigenität der untersuchten Zellen. Dabei kam es dennoch zur Abnahme von CD24 und EpCAM und zur Zunahme von *sphere* Bildungskapazität.<sup>68</sup> Lehmann et al. beschrieben weiter, dass etablierte Krebsstammzellmarker nicht mit der Tumorigenität von Tumor-initiierenden Zellen *in vivo* korrelierten. In ihrem Versuchsaufbau untersuchte die Gruppe unter anderem CD44, CD24, EpCAM, E-Cadherin und *sphere* Bildungskapazität von Brustkrebszellen. Dabei verwendete die Gruppe eine wenig und eine stark tumorigene Zelllinie. Beide Zelllinien waren unabhängig von ihrer Tumorigenität  $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ , sodass diese Oberflächenmolekülkonstellation keinen adäquaten Nachweis ihrer Tumorigenität erbrachte. Ferner beschrieb die Gruppe, dass EpCAM und E-Cadherin in den untersuchten Zelllinien gänzlich fehlten, was der Tatsache geschuldet sein dürfte, dass es sich bei den untersuchten Zelllinien um basal-ähnliche Zelllinien handelte.<sup>69</sup> Insgesamt wurde mit der Arbeit von Lehmann et al. gezeigt, dass zellintrinsische, genetische und funktionelle Marker nicht (zwangsläufig) indikativ für eine *in vivo* Tumorigenität beziehungsweise für eine Mammakarzinom-indizierende Kapazität sind. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von EMT- und Stammzell-spezifischen Transkriptionsfaktoren von der verwendeten Zelllinie abhängt.<sup>77</sup>

Es ist möglich, dass durch Zytostatika Behandlung in BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 zwar Resistenzen aber keine durch EMT und vermehrte Aneignung von Stammzeleigenschaften erhöhte Tumorigenität in den Zellen entstanden ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass gängige und in der Literatur vielfach beschriebene EMT- und CSC-Marker keine uneingeschränkt geeigneten Biomarker zum Nachweis von EMT und Stammzeleigenschaften sind. Unter anderem hängt die Aussagekraft der Biomarker vom Charakter der verwendeten Zelllinie ab.<sup>77,78</sup> Außerdem wird die Tumorigenität von Zellen durch die gängigen Biomarker nicht eindeutig erfasst.<sup>68,69</sup> Es ist also weiterhin essenziell,

nach geeigneten und zweifelsfreien Markern zur Identifizierung der tumorigenen Subpopulation im Tumor zu forschen.

Es ist sehr wichtig, die Tumorzellen und potenziellen Tumorstammzellen auch in ihrem Habitat, dem *tumor microenvironment (TME)*, zu untersuchen, da dieses sicherlich einen Einfluss auf die Tumorzellen hat. Der Zellkultur, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, fehlen die Einflüsse des *environments* gänzlich. Zum TME zählen unter anderem Stromazellen und die Extrazellulärmatrix. Stromazellen des *environments* haben die Fähigkeit, durch parakrine und juxtakrine Signale unter anderem die Hyperproliferation in Tumorzellen zu unterstützen. Infiltrierende Immunzellen (IIC) stellen direkte und indirekte Wachstumsfaktoren bereit, die nicht nur die Tumorzellen sondern auch die umgebenden Stromazellen stimulieren. Dazu gehören unter anderem EGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , FGF und verschiedene Interleukine, Chemokine, Histamin und Heparine. Zusätzlich sezernieren die IICs auch proteolytische Enzyme wie Metallo-, Serin- und Cystein- Proteasen, welche die Struktur und Funktion der Extrazellulärmatrix modifizieren können. Krebs-assoziierte Fibroblastenzellen (CAFs) in Form mesenchymaler Stammzellen werden rekrutiert und können sich in verschiedene Zelltypen umwandeln, welche wiederum verschiedene Signalfaktoren (zum Beispiel HGF, EGF, IGF-1 und verschiedene FGFs) sezernieren, die die Proliferation der Tumorzellen enthemmen, aber auch die Invasion und Metastasierung der Tumorzellen begünstigen.<sup>84,85</sup> Bei Krebsstammzellen nimmt man an, dass diese in speziellen Nischen im *tumor microenvironment* residieren. Die Umgebung der Tumorzellen hat also einen sehr großen Einfluss auf die Tumorzellen und sollte in weiterführenden Experimenten berücksichtigt und untersucht werden.

## 7 Zusammenfassung

Für die Zytostatika-resistenten BT-474, SK-BR-3 und JIMT-1 Zellen konnten mittels gemessener EMT und Stammzell-spezifischer Marker jeweils ein Marker-Profil erstellt werden. Es ließ sich für keine resistente Zelllinie ein eindeutiger Trend erkennen, bei welchem sich die diversen Moleküle und funktionellen Eigenschaften der untersuchten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Sinne der in der Literatur beschriebenen Phänomene veränderten. Ein derartiger Befund wurde schon 2012 von Lehmann et al. beschrieben.<sup>69</sup> Es traf allerdings für einige Zellen durchaus zu, dass sich einige Marker im Markerprofil so veränderten, dass man - basierend auf der in der Literatur beschriebenen EMT- und Stammzell-spezifischen Marker - vermuten kann, dass es eben zu einem vermehrten mesenchymalen und Stammzell-typischen Charakter der Zellen gekommen ist. Andererseits kam es teilweise zu Markerveränderungen, die genau entgegengesetzt der Erwartungen waren und teilweise kam es zu keinen Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Abgeleitet von den Beobachtungen in dieser Arbeit lässt sich vermuten, dass die in der Literatur beschriebenen Marker zur Bestimmung von EMT und Stammzeleigenschaften teilweise für die Zelllinie BT-474 (hier vor allem EpCAM und der *sphere* Assay) und für die Zelllinie JIMT-1 (hier vor allem CD44, E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin) anwendbar sind. Man kann vorsichtig vermuten, dass diese beiden Zelllinien auch über die erworbenen Resistenzen gegenüber den Zytostatika Paclitaxel und Epirubicin tatsächlich EMT durchlaufen und somit vermehrt mesenchymalen und Stammzell-typischen Charakter haben. Man könnte ergänzend zu den untersuchten Markern weitere funktionelle Stammzellmarker wie ALDH1 und Hoechst *Side Population* erfassen und die Tumorigenität der Zytostatika-resistenten Zellen im Mausmodell überprüfen (laut Dittmer et al. der Standard zur Erfassung von Tumorigenität), um die Markerprofile der resistenten Zellen weiterauszubauen.<sup>20</sup> Damit könnte man die Marker hinsichtlich EMT und Stammzell-Charakter weiter evaluieren und testen, ob sich diese Marker für die hier in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien eignen. Schlussendlich kann man vermeintlich davon ausgehen, dass die Marker der Literatur nicht für jede Zelllinie geeignet sind. Es müssten jeweils für die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien reliable Marker gefunden werden, um sicher feststellen zu können, ob eben durch Zytostatika Behandlung induzierte Zytostatika-resistente Zellen tatsächlich EMT durchlaufen und somit vermehrt Stammzeleigenschaften erworben haben. Da die Zelllinien lediglich Modelle für Vorgänge im menschlichen Organismus sind, ist am Ende entscheidend, ob die Marker auch *in vivo* unter *human (like) conditions* funktionieren

wie im Labor getestet. Dabei ist es wichtig, die Tumorzellen in Zusammenhang mit ihrem *tumor microenvironment* zu untersuchen.

## 8 Ausblick

Die Entdeckung von Krebsstammzellen als Ausgangspunkt von Tumoren ist ein Meilenstein in der Krebsforschung. Dennoch sind die funktionellen und morphologischen Eigenschaften von Krebsstammzellen erst im Ansatz verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. Es ist essenziell, Marker zu definieren, um Krebsstammzellen sicher identifizieren zu können. Es müssten standardisierte Methoden etabliert werden, die Vergleiche zwischen unterschiedlichen Forschungsarbeiten zulassen. Erst dann wird es möglich, die Physio- und Pathologie von Krebsstammzellen zu verstehen und Krebsstammzell-spezifische Angriffspunkte für therapeutische Zwecke zu entdecken. Möglicherweise können so Patienten nicht nur geheilt, sondern auch vor nebenwirkungsreichen zytotoxischen Behandlungen bewahrt werden. Außerdem muss überprüft werden, ob, wie bereits vermutet, Chemotherapie die Induktion von EMT und CSCs begünstigt. Jannasch et al. konnten zeigen, dass in Mäuse implantierte Mammakarzinomzellen nach zytostatischer Behandlung vermehrt einen mesenchymalen Phänotyp aufwiesen und dass es zu vermehrt disseminierten Tumorzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kam.<sup>46</sup> Es ist wichtig zu klären, ob die zytotoxische Behandlung von Mammakarzinomzellen zu einer Tumorzell-Dedifferenzierung führen kann. Möglicherweise müssten Konsequenzen für bereits etablierte Therapie-Strategien wie die neoadjuvante Chemotherapie gezogen werden, da hier mehr Tumorzellen den Zytostatika ausgesetzt werden als wenn erst nach operativer Entfernung des Tumors mit der Chemotherapie begonnen wird. Somit erhöht sich einerseits die Wahrscheinlichkeit, dass sich einige Tumorzellen mittels Resistenzentwicklung der Zytostatika-Behandlung entziehen und eventuell sogar eine Dedifferenzierung durch EMT durchlaufen, was ferner möglicherweise zu einem Gewinn von Stammzeleigenschaften führen kann. Andererseits selektiert man möglicherweise Krebsstammzellen von vornherein, da diese eine intrinsische Resistenz gegenüber Zytostatika besitzen. Stammzellen sind nicht nur widerstandsfähiger gegenüber Zytostatika, sondern stellen auch die Tumor-initiierende Subpopulation dar. Entstehen also durch Zytostatika-Behandlung vermehrt Stammzellen, dann kann es vermeintlich einerseits zur vermehrten Zytostatika-Resistenz und andererseits zu einem verstärkten Tumor-Wachstum kommen. Es ist außerdem essenziell zu evaluieren, ob Stammzellen auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Radiatio<sup>86</sup>, antihormonellen Substanzen und Antikörpern im Rahmen der *targeted therapy*<sup>87</sup> besitzen, und ferner, ob diese Behandlungen bei Anwendung

ähnlich wie bei der Zytostatika Behandlung Resistenzen in den Zellen auslösen und wiederum vermeintlich EMT in den Krebszellen induzieren können.

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Markern und Eigenschaften wurden in der gegenwärtigen Literatur bereits andere Methoden zur Untersuchung von EMT und Stammzellen vorgestellt. Zusätzlich zur Untersuchung von Proteinen spielen dabei die Forschung auf Gen-Ebene und Untersuchungen im Xenograft Modell eine wichtige Rolle. Es ist außerdem wichtig, die Umgebung der Stammzellen - Nachbarzellen, Immunzellen und die Extrazellulärmatrix - besser zu verstehen, da diese im Kontext mit der Malignität von Krebsstammzellen steht. Sie wird auch als Stammzell-Nische bezeichnet. Als Alternativen zu *sphere*-Assays wurden durch Bioengineering 2D- und 3D-Kulturen entwickelt, die die *in vivo* Extrazellulärmatrix und Substrat-Elastizität nachahmen sollen. Der in der neuronalen Stammzellforschung zunehmend weit verbreitete *neuronal colony forming cell assay* (NCFCA) ermöglicht die Zellkultur in einer Kollagen-haltigen semi-soliden Matrix unter Zugabe von Wachstumsfaktoren. Stammzellen werden in diesen Assays mittels Kolonie-Größe definiert: große Kolonien werden Stammzellen zugeschrieben, kleinere Progenitorzellen. Dieses Assay umgeht somit die Problematik der Zellaggregation in *sphere*-Assays. Ein weiterer Ansatz ist die sogenannte Co-Kultur von Stammzellen mit unterschiedlichen Stammzell-Nische Zellen ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Somit können physiologische Signale durch Zellen der Nische gewährleistet werden. Eine weitere vielversprechende Methode sind die dreidimensionalen Matrigel Kulturen. Diese können eine angemessene Mikroumgebung für die klonale Bildung von Mini-Organen aus einzelnen Stammzellen und unterschiedlichen Nische-Zellen gewährleisten.<sup>62</sup>

## 9 Inhaltsverzeichnis

1. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3:453–8.
2. Patterns of relapse and long-term complications of therapy in breast cancer survivors. (Accessed 25.08.16, at [http://www.uptodate.com/contents/patterns-of-relapse-and-long-term-complications-of-therapy-in-breast-cancer-survivors?source=see\\_link&sectionName=Metastatic+disease&anchor=H5#H5](http://www.uptodate.com/contents/patterns-of-relapse-and-long-term-complications-of-therapy-in-breast-cancer-survivors?source=see_link&sectionName=Metastatic+disease&anchor=H5#H5)).
3. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989;8:98–101.
4. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009;9:302–12.
5. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005;233:706–20.
6. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105–11.
7. Caixeiro NJ, Kienle N, Lim SH, et al. Circulating tumour cells--a bona fide cause of metastatic cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2014;33:747–56.
8. Baccelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol* 2012;198:281–93.
9. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983–8.
10. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 2003;36 Suppl 1:59–72.
11. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008;14:818–29.
12. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442–54.
13. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie, 10 Tabellen. 3rd ed. Stuttgart: Thieme, 2009. 644 p. ISBN: 978-3-13-129243-8.
14. Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol* 2012;3:117–36.
15. Meulmeester E, Dijke P ten. The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. *J Pathol* 2011;223:205–18.
16. Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 2017;169:985–99.
17. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1014:155–63.
18. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002;39:527–79.
19. Meyer MJ, Fleming JM, Ali MA, Pesesky MW, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44posCD24neg phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 2009;11:R82.
20. Dittmer J, Rody A. Cancer stem cells in breast cancer. *Histol Histopathol* 2013;28:827–38.

21. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255:1707–10.
22. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003;17:1253–70.
23. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996;183:1797–806.
24. Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 2002;20:11–20.
25. Tanaka H, Nakamura M, Kameda C, et al. The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>/low subpopulation and the side population of breast cancer cells. *Anticancer Res* 2009;29:2147–57.
26. Mani SA, Guo W, Liao M-J, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–15.
27. Gires O, Stoecklein NH. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:4393–402.
28. Driemel C, Kremling H, Schumacher S, et al. Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene* 2014;33:4904–15.
29. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008;10:R25.
30. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011;146:633–44.
31. Gires O. Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:4009–22.
32. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 2013;31:539–44.
33. Baccelli I, Stenzinger A, Vogel V, et al. Co-expression of MET and CD47 is a novel prognosticator for survival of luminal breast cancer patients. *Oncotarget* 2014;5:8147–60.
34. Nagahara M, Mimori K, Kataoka A, et al. Correlated expression of CD47 and SIRPA in bone marrow and in peripheral blood predicts recurrence in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010;16:4625–35.
35. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 2009;138:286–99.
36. Willingham SB, Volkmer J-P, Gentles AJ, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:6662–7.
37. Steinert G, Schölch S, Niemietz T, et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res* 2014;74:1694–704.
38. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:834–48.
39. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature* 2006;441:444–50.
40. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:7479–91.



41. Nahta R, Yu D, Hung M-C, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3:269–80.
42. Targeted therapy for breast cancer. (Accessed 15.10.16, at <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-targeted-therapy>).
43. Magnifico A, Albano L, Campaner S, et al. Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clin Cancer Res* 2009;15:2010–21.
44. Li X, Lewis MT, Huang J, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:672–9.
45. Huang J, Li H, Ren G. Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (Review). *Int J Oncol* 2015;47:840–8.
46. Jannasch K, Wegwitz F, Lenfert E, Maenz C, Deppert W, Alves F. Chemotherapy of WAP-T mouse mammary carcinomas aggravates tumor phenotype and enhances tumor cell dissemination. *Int J Cancer* 2015;137:25–36.
47. Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff. Grundlagen der Durchflusszytometrie. Uni Regensburg, 2015. (11. Mini-Workshop Durchflusszytometrie).
48. Becton DaC. BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual 2006.
49. Becton DaC. BD FACSCanto II, A proven research platform for maximum reliability and the highest quality results 2012.
50. BD Biosciences. An Introduction to Compensation for Multicolor Assays on Digital Flow Cytometers 2009.
51. BD Biosciences. BD Biosciences Fluorescence Spectrum Viewer for Multicolor Flow Cytometry, 2009. (Accessed 18.10.16, at [https://www.bdbiosciences.com/br/research/multicolor/spectrum\\_viewer/index.jsp](https://www.bdbiosciences.com/br/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp)).
52. BioLegend Blog - The Stain Index: What Is It and What Does It Tell You? (Accessed 11.02.16, at <http://www.biolegend.com/newsdetail/1245/>).
53. Sack U. Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: S. Karger, 2007. 1112 p. ISBN: 978-3805579285.
54. BT-474 ATCC® HTB-20™ Homo sapiens mammary gland; breast/duc. (Accessed 08.10.15, at [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-20.aspx?geo\\_country=de#generalinformation](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-20.aspx?geo_country=de#generalinformation)).
55. Lasfargues EY, Coutinho WG, Redfield ES. Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1978;61:967–78.
56. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 2011;13:215.
57. SK-BR-3 [SKBR3] ATCC® HTB-30™ Homo sapiens mammary gland/br. (Accessed 08.10.15, at <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-30.aspx#characteristics>).
58. Engel LW, Young NA. Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res* 1978;38:4327–39.
59. Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, et al. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1585–92. (<http://mct.aacrjournals.org/content/3/12/1585.full>).
60. CST - TGF-β Receptor I Antibody. (Accessed 18.10.16, at <https://www.cellsignal.com/product/productDetail.jsp?productId=3712>).

- 61.** Recombinant Human TGF-beta RII Protein 241-R2-025: R&D Systems. (Accessed 18.10.16, at [https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-tgf-beta-rii-protein\\_241-r2](https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-tgf-beta-rii-protein_241-r2)).
- 62.** Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 2011;8:486–98.
- 63.** Pierce Biotechnology. Instructions: Pierce BCA Protein Assay Kit. (Accessed February 8, 2016, at [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430\\_Pierce\\_BCA\\_Protein\\_Asy\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf)).
- 64.** Universität Regensburg, Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin. Biochemisches Praktikum für Studierende der Medizin. 40th ed., 2012/2013.
- 65.** Rassow J. [Th.] Duale Reihe Biochemie (2012) // Biochemie, Mit 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen]. 3rd ed. Stuttgart: Thieme, 2012. 866 p. (Duale Reihe). ISBN: 978-3-13-125353-8.
- 66.** Schneider A, Hommel G, Blettner M. Linear regression analysis: part 14 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107:776–82. (Accessed 16.02.16, at <http://www.uni-kiel.de/medinfo/lehre/seminare/methodik/Dtsch%20Arztebl%2014%20Lineare%20Regressionanalyse.pdf>).
- 67.** Hiraguri S, Godfrey T, Nakamura H, et al. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1998;58:1972–7.
- 68.** Huber S, Wege AK, Bernhardt G, Buschauer A, Brockhoff G. Topotecan-induced ABCG2 expression in MCF-7 cells is associated with decreased CD24 and EpCAM expression and a loss of tumorigenicity. *Cytometry A* 2015;87:707–16.
- 69.** Lehmann C, Jobs G, Thomas M, Burtscher H, Kubbies M. established breast cancer stem cell markers do not correlate with in vivo tumorigenicity of tumor-initiating cells. *Int J Oncol* 2012.
- 70.** Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, et al. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008;10:R52.
- 71.** Weissman I. How One Thing Led to Another. *Annu Rev Immunol* 2016;34:1–30.
- 72.** Hirose A, Tajima H, Ohta T, et al. Low-dose paclitaxel inhibits the induction of epidermal-mesenchymal transition in the human cholangiocarcinoma CCKS-1 cell line. *Oncol Lett* 2013;6:915–20.
- 73.** Aigner K, Dampier B, Descovich L, et al. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 2007;26:6979–88.
- 74.** Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76–83.
- 75.** Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2005;12:488–96.
- 76.** Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7:415–28.

77. Pomp V, Leo C, Mauracher A, Korol D, Guo W, Varga Z. Differential expression of epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in intrinsic subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015;154:45–55.
78. Manuel Iglesias J, Belouqui I, Garcia-Garcia F, et al. Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PLoS ONE* 2013;8:e77281.
79. Coles-Takabe BLK, Brain I, Purpura KA, et al. Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies. *Stem Cells* 2008;26:2938–44.
80. Chojnacki A, Weiss S. Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells. *Nat Protoc* 2008;3:935–40.
81. Ferron SR, Andreu-Agullo C, Mira H, Sanchez P, Marques-Torrejón MA, Farinas I. A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells. *Nat Protoc* 2007;2:849–59.
82. Mori H, Ninomiya K, Kino-oka M, et al. Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells. *J Neurosci Res* 2006;84:1682–91.
83. Singec I, Knoth R, Meyer RP, et al. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods* 2006;3:801–6.
84. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime, Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012;21:309–22.
85. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer, The next generation. *Cell* 2011;144:646–74.
86. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med* 2017;23:1124–34.
87. Dave B, Mittal V, Tan NM, Chang JC. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res* 2012;14:202.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Gero Brockhoff für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Ich möchte mich besonders für die interessante Themenstellung, die exzellente Betreuung, die prompte Antwort bei jeder Art von Fragen, die zahlreichen Diskussionen mit richtungsweisenden Ratschlägen, die Einweisung in die Durchflusszytometrie und die Unterstützung zur Verfassung dieser Arbeit bedanken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich ebenso bei Frau PD Dr. med. vet. Anja-Kathrin Wege für Ihre Ratschläge und unermüdliche Hilfsbereitschaft, für die außerordentlich hilfreiche Einweisung und Beratung zur Durchflusszytometrie und für die Hilfe zur Erstellung von Graphen. Ihr Einsatz und die vielen fruchtbaren Gespräche haben mir stets sehr viel weitergeholfen.

Danken möchte ich weiterhin Frau Marietta Bock für die sehr geduldige und qualifizierte Einweisung in die SDS-PAGE und Western Blot Technik sowie in alle Bereiche der Zellkultur. Ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihre kompetenten Ratschläge haben mir bei so manchem Problem weitergeholfen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Gerhard Piendl, der mir in Fragen zur Durchflusszytometrie immer beiseite stand und mich tatkräftig unterstützte.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Brockhoff für die freundliche und kollegiale Atmosphäre, die ich während der gesamten Arbeit erfahren durfte.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. rer. nat. Witold Chmielewski für die geduldige Beratung zur Benutzung des SPSS Statistik Programms.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern Dina und Kurt Kohl danken, deren unerschöpfliche Unterstützung mir das Medizinstudium und die Erstellung dieser Arbeit ermöglichten.